



**Tiago José Tavares
Teixeira**

Caracterização de nanopartículas de ouro em solos



**Tiago José Tavares
Teixeira**

Caracterização de nanopartículas de ouro em solos

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química, ramo de Química Analítica e Qualidade, realizada sob a orientação científica da Doutora Sónia Alexandra Morais Rodrigues, Bolseira de Pós Doutoramento do CESAM/Departamento de Química e da Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Este trabalho é financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto PTDC/AGR-PRO/4091/2012.

agradecimentos

À minha orientadora, Doutora Sónia Alexandra Morais Rodrigues, o meu mais profundo e sincero agradecimento pela sábia orientação, apoio e incentivo constantes ao longo deste ano e pelo rigor e sentido de responsabilidade exigidos que contribuíram para o desenvolvimento da minha formação.

À minha coorientadora, Professora Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, pela oportunidade de trabalhar consigo e ter integrado o grupo de Analítica do CESAM.

O meu obrigado ao Nuno Cruz pela preciosa ajuda na digestão das amostras.

Agradeço à Daniela Tavares pela ajuda na síntese e caracterização da suspensão de nanopartículas de ouro.

Um agradecimento ainda ao Professor Tito Trindade que disponibilizou o laboratório e as técnicas de síntese de nanopartículas de ouro.

A todos os meus colegas de laboratório pelo simpático acolhimento e ajuda sempre que necessitei.

Às pessoas que me acompanharam neste percurso universitário ao longo destes anos, não posso deixar de agradecer a amizade demonstrada. O meu obrigado à Rute, à Filipa, à Joana, à Leonor, à Tatiana, ao Rui, ao André, ao Steve, ao David, à Mónica, ao Samuel, à Vitó, à Inês.

Agradeço ainda a todos os familiares e amigos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, pelo encorajamento, apoio e carinhosa atenção sempre manifestados.

Aos meus pais e irmão o meu muito obrigado por acreditarem que sou capaz, pelo carinho, sabedoria e apoio incondicional, agradeço a vossa paciência comigo!

Aos meus pais

o júri

Presidente

Prof. Doutor Artur Manuel Soares da Silva

Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor David Paulo Figueiro

Bolseiro de Pós-Doutoramento do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

palavras-chave

Nanopartículas de ouro artificiais, elementos potencialmente tóxicos, propriedades do solo, cadeia trófica, avaliação de riscos, transferência solo-solução do solo.

Resumo

A crescente utilização de nanopartículas em aplicações industriais e domésticas tem causado a liberação deste tipo de materiais no ambiente. Avaliar os riscos da presença de nanopartículas em ecossistemas terrestres requer uma compreensão da mobilidade, reatividade, persistência e potencial de transferência na cadeia trófica. Este trabalho tem como principal objetivo a detecção e caracterização de nanopartículas de ouro no solo e na solução do solo. São também avaliadas as interações entre nanopartículas de ouro artificiais e os constituintes do solo, necessárias para determinar a partição solo-solução destas nanopartículas e o seu comportamento em sistemas terrestres.

Através de síntese foram obtidas nanopartículas de ouro com 17,8 nm de diâmetro e um potencial zeta de -42,8 mV. Foram preparadas suspensões de nanopartículas com três concentrações (suspensão A: 16,8 mg L⁻¹, B: 8,3 mg L⁻¹ e C: 3,2 mg L⁻¹). A suspensão de nanopartículas foi adicionada a vasos contendo solo, tendo-se recolhido amostras de solução do solo ao longo de 120 dias. A percentagem de ouro nas amostras de solução nunca ultrapassa os 23,0% da concentração inicial adicionada ao solo. No caso da suspensão A varia entre 12,6% às 24 horas até 0,8% ao 15º dia. Na suspensão B varia entre 21,8% às 24 horas até 2,5% ao 10º dia. Por fim, na suspensão C varia entre 23,0% às 24 horas até 4,4% ao 7º dia. A lixiviação de nanopartículas de ouro do solo para a solução do solo ocorre apenas numa fase inicial depois da sua adição aos solos.

Finalmente, foram efetuadas extrações químicas (0,43 mol L⁻¹ HNO₃, 2 mol L⁻¹ HNO₃ e extração *in vitro* para avaliação da bio acessibilidade (método "SBET")) da fração sólida para avaliar a reatividade do ouro retido no solo. Tendo em consideração que a concentração de ouro extraída por estes métodos foi inferior ao limite de detecção (0,12 mg L⁻¹) conclui-se que as nanopartículas de ouro retidas na matriz do solo exibem uma reatividade muito reduzida.

Keywords

Gold engineered nanoparticles, potentially toxic elements, soil properties, trophic chain, risk assessment, soil-soil solution transfer.

Abstract

The increasing use of nanoparticles (ENPs) in industrial and household applications will lead to the release of such materials into the environment. Assessing the risks of these nanoparticles in the environment requires an understanding of their mobility, reactivity, persistency and potential transfer in the trophic chain.

The present work focuses on the detection and characterization of gold nanoparticles in soil and soil solution as well as in the interaction between gold ENPs and soil constituents necessary to evaluate soil – solution partitioning.

Spherical gold nanoparticles were obtained with 17,8 nm in diameter and zeta potential -42,8 mV. Suspensions with three different gold concentrations (suspension A: 16,8 mg L⁻¹, B: 8,3 mg L⁻¹ e C: 3,2 mg L⁻¹) were prepared and added into pots containing soil. Soil solution samples were collected along 120 days. The percentage of gold in soil solution never exceeded 23,0% of the gold concentration in the suspension added to soils. In case of the suspension A gold concentration varied between 12,6% in the 1st day to 0,8% in the 15th day. In suspension B this concentration varied between 21,8% in the 1st day to 2,5% in the 10th day. Finally, the suspension C varied between 23,0% in the 1st day to 4,4% in day 7. Leaching of gold nanoparticles for the soil occurs only at an early stage after their addition to soils.

Finally, chemical extractions (0,43 mol L⁻¹ HNO₃, 2 mol L⁻¹ HNO₃ and an *in vitro* bioaccessibility test ("SBET")) were applied to the solid matrix to assess the reactivity of gold nanoparticles retained in soils. Since gold concentrations extracted by these methods were below detection limit (0,12 mg L⁻¹), it can be concluded that gold nanoparticles retained in the solid fraction exhibit very low reactivity.

Índice

1. INTRODUÇÃO	3
1.1. DEFINIÇÃO E PRINCIPAIS TIPOS DE NANOPARTÍCULAS	3
1.1.1. PRINCIPAIS UTILIZAÇÕES DAS NANOPARTÍCULAS	4
1.2. METODOLOGIAS USADAS NA CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS	7
1.3. PROCESSOS QUE AFETAM O COMPORTAMENTO QUÍMICO E FÍSICO NO AMBIENTE E AS PROPRIEDADES DAS NANOPARTÍCULAS	11
1.4. PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS NO AMBIENTE	12
1.5. TOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS	15
1.6. TRANSFERÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS NA CADEIA TRÓFICA TERRESTRE	19
1.7. OBJETIVOS	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	25
2.1. SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO	25
2.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	26
2.3. CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	28
2.4. PROPRIEDADES DA SOLUÇÃO DO SOLO	29
2.5. QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE OURO NA SOLUÇÃO DE SOLO	29
2.6. DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO REATIVA DE OURO NO SOLO	30
2.7. DETERMINAÇÃO DA FRAÇÃO BIO ACESSÍVEL.....	31
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO	35
3.2. AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA SOLO-SOLUÇÃO E EFEITO DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE OURO NESSA TRANSFERÊNCIA – EXPERIÊNCIA 1	38
3.3. AVALIAÇÃO DA TRANSFERÊNCIA SOLO-SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO EM DIFERENTES TIPOS DE SOLO – EXPERIÊNCIA 2.....	53
3.4. EXTRAÇÕES DA FRAÇÃO SÓLIDA	65
4. CONCLUSÃO.....	69
5. BIBLIOGRAFIA	75

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Análise de variância dos resultados para o pH da solução de solo à superfície (S) e no fundo (F) para as amostras (Rep3, Rep6, Rep9) recolhidas nos vasos onde foram adicionadas as diferentes suspensões de nanopartículas (suspensão A, B e C). São também apresentados resultados para os valores de pH dos respectivos brancos (BR3, BR6, BR9).	43
Tabela 2 – Análise de variância dos resultados para a condutividade da solução de solo à superfície (S) e no fundo (F) para as amostras (Rep3, Rep6, Rep9) recolhidas nos vasos onde foram adicionadas as diferentes suspensões de nanopartículas (Suspensão A, B e C). São também apresentados resultados para os valores de condutividade dos respectivos brancos (BR3, BR6, BR9).	46
Tabela 3 – Análise de variância dos resultados para o pH da solução de solo à superfície (S) e no fundo (F) para as amostras (ALJ7, ALJ5, LOUSAL02, LOUSAL22, EST11A, LOUSAL21, EST5A e EST12A) recolhidas nos vasos onde foram adicionadas a suspensão de nanopartículas (suspensão A). São também apresentados resultados para os valores de pH dos respectivos brancos.	56
Tabela 4 – Análise de variância dos resultados para a condutividade da solução de solo à superfície (S) e no fundo (F) para as amostras (ALJ7, ALJ5, LOUSAL02, LOUSAL22, EST11A, LOUSAL21, EST5A e EST12A) recolhidas nos vasos onde foram adicionadas a suspensão de nanopartículas (suspensão A). São também apresentados resultados para os valores de condutividade dos respectivos brancos.	62
Tabela 5 – Concentração de ouro e propriedades do solo usado na avaliação da transferência solo-solução de nanopartículas de ouro para as amostras à superfície do solo.	65

Índice de Figuras

Figura 1 – Esquema dos processos de transformação da amostra no plasma.	9
Figura 2 – Esquema geral de um equipamento de ICP-OES.....	10
Figura 3 – Esquema representativo da síntese de nanopartículas de ouro.	25
Figura 4 – Imagem da montagem experimental usada na síntese de nanopartículas de ouro.....	25
Figura 5 – Vaso contendo solo e os amostradores para recolha da solução de solo.	27
Figura 6 – Amostrador para recolha da solução de solo.	28
Figura 7 – Esquema sobre a constituição do amostrador.	28
Figura 8 – Grelha de cobre usada para a preparação de amostras para análise por TEM.	29
Figura 9 – Imagens da suspensão de nanopartículas de ouro obtida por TEM.	35
Figura 10 – Histograma do tamanho das nanopartículas de ouro.	36
Figura 11 – Espectro de absorvância de UV-VIS das diferentes suspensões de nanopartículas de ouro.....	37
Figura 12 – Potencial zeta da suspensão de nanopartículas de ouro.	37
Figura 13 – Concentração de ouro nas amostras de suspensão de nanopartículas após passagem pelos amostradores do tipo “Rhizon Flex”.	38
Figura 14 – Espectro de absorvância da suspensão A ao longo do tempo.	39
Figura 15 – Espectro de absorvância da suspensão B ao longo do tempo.	39
Figura 16 – Espectro de absorvância da suspensão C ao longo do tempo.	40
Figura 17 – pH da solução de solo para a suspensão A ao longo do tempo.....	41
Figura 18 – pH da solução de solo para a suspensão B ao longo do tempo.....	41
Figura 19 – pH da solução de solo para a suspensão C ao longo do tempo.....	41
Figura 20 – Condutividade da solução de solo para a suspensão A ao longo do tempo.	45
Figura 21 – Condutividade da solução de solo para a suspensão B ao longo do tempo.	45
Figura 22 – Condutividade da solução de solo para a suspensão C ao longo do tempo.	45
Figura 23 – Concentração de ouro da suspensão A à superfície do solo.	49
Figura 24 – Concentração de ouro da suspensão B à superfície do solo.....	49
Figura 25 – Concentração de ouro da suspensão C à superfície do solo.....	49

Figura 26 – Gráficos de dispersão que relacionam a concentração de ouro (mg L^{-1}) na solução de solo e as propriedades do solo na suspensão A.	50
Figura 27 – Gráficos de dispersão que relacionam a concentração de ouro (mg L^{-1}) na solução de solo e as propriedades do solo na suspensão B.	51
Figura 28 – Gráficos de dispersão que relacionam a concentração de ouro (mg L^{-1}) na solução de solo e as propriedades do solo na suspensão C.	52
Figura 29 – pH da solução de solo da amostra Aljustrel 7.	54
Figura 30 – pH da solução de solo da amostra Aljustrel 5.	54
Figura 31 – pH da solução de solo da amostra Lousal 02.	54
Figura 32 – pH da solução de solo da amostra Lousal 22.	55
Figura 33 – pH da solução de solo da amostra Estarreja 11A.	55
Figura 34 – pH da solução de solo da amostra Lousal 21.	55
Figura 35 – pH da solução de solo da amostra Estarreja 5A.	56
Figura 36 – pH da solução de solo da amostra Estarreja 12A.	56
Figura 37 – Condutividade da solução de solo da amostra Aljustrel 7.	59
Figura 38 – Condutividade da solução de solo da amostra Aljustrel 5.	60
Figura 39 – Condutividade da solução de solo da amostra Lousal 02.	60
Figura 40 – Condutividade da solução de solo da amostra Lousal 22.	60
Figura 41 – Condutividade da solução de solo da amostra Estarreja 11A.	61
Figura 42 – Condutividade da solução de solo da amostra Lousal 21.	61
Figura 43 – Condutividade da solução de solo da amostra Estarreja 5A.	61
Figura 44 – Condutividade da solução de solo da amostra Estarreja 12A.	62

Capítulo 1

Introdução

1. Introdução

1.1. Definição e principais tipos de nanopartículas

O termo “nanotecnologia” está habitualmente associado ao estudo de materiais ao nível da nanoescala (aproximadamente entre 1 e 100 nm (Rotello, 2003)), incluindo o estudo da síntese e da formação de nanoestruturas bem definidas ou “nanomateriais” (Rosi and Mirkin, 2005). Desde a década de 90 houve um crescimento rápido no desenvolvimento e na implementação de nanotecnologias. A investigação desenvolvida nesta área traduziu-se em aplicações práticas em muitas áreas da indústria e da produção comercial. Em 2004, a produção mundial de nanomateriais ascendeu a cerca de 1000 toneladas (Maynard, 2006). Estima-se que atualmente existam mais de 800 produtos de uso diário baseados em nanotecnologias e que muitos nanomateriais novos deverão aparecer no mercado nos próximos anos (Rejeski and Lekas, 2008).

As nanopartículas podem ser de origem natural ou de origem antropogénica. Estas partículas podem ser ainda categorizadas em materiais à base de carbono, como fulerenos e nanotubos de carbono, polímeros orgânicos (dendrímeros, poliestireno) e ainda nanopartículas inorgânicas, incluindo as nanopartículas de óxidos metálicos (óxido de zinco, óxido de ferro, dióxido de titânio e óxido de cério), de metais (ouro, prata e ferro), os compostos como o óxido de Co-Zn-Fe (Ju-Nam and Lead, 2008; Norwegian Pollution Control Authority, 2008). As nanopartículas naturais contendo carbono são divididas em biogénicas, geogénicas, atmosféricas e pirogénicas (Nowack and Bucheli, 2007). Exemplos de nanopartículas naturais são os fulerenos e os nanotubos de carbono de origem pirogénica ou geogénica, magnetite biogénica ou aerossóis atmosféricos (orgânicos tais como ácidos orgânicos e inorgânicos como o sal do mar). As nanopartículas antropogénicas podem ser inadvertidamente formadas como um sub-produto de um determinado processo, por exemplo durante a combustão de determinados materiais, ou produzidas intencionalmente devido às suas características particulares (Nowack and Bucheli, 2007). Neste último caso, elas são muitas vezes referidas como nanopartículas artificiais e são o foco principal da investigação atual sobre nanopartículas no ambiente (Nowack and Bucheli, 2007).

Os materiais produzidos à nanoescala podem mostrar propriedades muito diferentes, em comparação com o que eles apresentam na macroescala, o que permite aplicações únicas (Dinesh et al., 2012). Por exemplo, substâncias opacas podem tornar-

se transparentes, materiais estáveis podem tornar-se combustíveis, materiais inertes podem tornar-se catalisadores (platina); isoladores podem tornar-se condutores (silicone) e sólidos podem transformar-se em líquidos à temperatura ambiente (ouro) (Hristozov and Malsch, 2009). As nanopartículas artificiais podem ser constituídas por elementos únicos como o carbono ou a prata ou por uma mistura de moléculas/elementos. As nanopartículas artificiais são frequentemente classificadas com base na sua composição química, ocasionalmente complementada com características morfológicas ou de tamanho. Em alguns casos podem também ocorrer misturas de diferentes nanomateriais. Além disso, estas nanopartículas também apresentam diferentes morfologias tais como esferas, tubos, hastes e prismas e podem existir em formas agregadas ou aglomeradas. As propriedades invulgares das nanopartículas têm acelerado o crescimento na produção de materiais em nanoescala e o rápido aumento das suas aplicações em muitas áreas tem captado a atenção de investigadores e indústria em todo o mundo (Ju-Nam and Lead, 2008). As nanopartículas artificiais são atualmente utilizadas em diferentes áreas como eletrónica, biomedicina, produtos farmacêuticos, cosméticos, análise ambiental e tratamento de águas, na produção de artigos desportivos, pneus, roupas resistentes a manchas, protetores solares, pasta dos dentes, aditivos alimentares entre outros (Colvin, 2003). A sua utilização crescente tem a ver com a relativa facilidade com que podem ser preparadas e manipuladas, a sua elevada reatividade e área de superfície e a natureza ajustável das suas propriedades óticas entre outras (Niemeyer, 2001; Poole and Owens, 2003; Schmid, 2004).

1.1.1. Principais utilizações das nanopartículas

De um modo geral, os nanotubos de carbono e as nanopartículas de prata têm uma vasta gama de aplicações. No entanto, as seguintes nanopartículas já são também utilizadas em escala industrial: prata, óxidos hidratados de alumínio e ferro, dióxido de silício, dióxido de titânio, óxido de zinco (Schmid e Riediker, 2008). Além disto, em 2002, uma instalação de produção de pó de óxido de índio e estanho foi lançada pela empresa “Samsung”. Esta substância é utilizada na produção de monitores planos com base em cristais líquidos. A utilização de nanopartículas em procedimentos médicos também se desenvolveu recentemente, por exemplo, como ferramentas de imagem, agentes de fototerapia e como agentes portadores de fármacos (Verma et al., 2008).

A manipulação bem-sucedida de nanopartículas magnéticas permitiu a sua utilização em técnicas de diagnóstico e biologia celular (Gao et al., 2008). Prevê-se que

as nanopartículas com propriedades magnéticas, tais como a magnetite e nanopartículas ferrofluídicas, em breve, encontrarão aplicação no transporte de substâncias químicas, por exemplo, na administração de fármacos na terapia do cancro (Shan et al., 2005). Na biologia celular, as nanopartículas fluorescentes são usadas na marcação de biomoléculas e em agentes contrastantes para visualização de processos fisiológicos por ressonância magnética (Kirchner et al., 2005).

As nanopartículas de prata são conhecidas por possuírem propriedades antibacterianas (Weir et al., 2008). As propriedades biocidas da prata têm sido utilizadas durante muitos séculos. Por exemplo, as nanopartículas de prata são incorporadas em frigoríficos para evitar o crescimento de fungos e de bactérias. Como as nanopartículas de prata, as nanopartículas de cobre também provaram inibir o crescimento de microrganismos e são utilizados como nano-biocidas (Yoon et al., 2007). Devido às suas propriedades esterilizantes e anti-incrustantes, as nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) são usadas para proteger vidraças de forma a manterem o brilho. Em alguns casos estas nanopartículas catalisam processos de decomposição facilitando a degradação de poluentes orgânicos e impedindo a formação de membranas bacterianas (Meyer et al., 2004; Ohde et al., 2005). Muitas tintas disponíveis no mercado contêm nanopartículas que inibem o crescimento de bolor e fungos (Kandavelu et al., 2004). Com o tempo, essas tintas podem tornar-se possíveis fontes de emissão de nanopartículas para o ambiente. Alguns nanomateriais são também utilizados na purificação de água – para reduzir as concentrações de componentes tóxicos (por exemplo, iões metálicos, compostos orgânicos e inorgânicos, assim como bactérias e vírus) para níveis de sub-ppb (partes por bilião) (Savage e Diallo, 2005). Por exemplo, os nanotubos de carbono são utilizados para a remoção de arsénio da água (Peng et al., 2005) bem como de iões metálicos tóxicos tais como Pb^{2+} , Cu^{2+} e Cd^{2+} (Li et al., 2003). As nanopartículas de ferro podem também ser usadas para o tratamento de águas subterrâneas contaminadas com bifenilos policlorados, pesticidas organoclorados e solventes orgânicos clorados (Zhang, 2003). As nanopartículas de poliuretano anfifílico podem ser usadas na remoção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de solos contaminados (Kim et al., 2003).

As propriedades das nanopartículas de ouro (elevada área superficial e reatividade) favorecem muitas aplicações em vários campos nomeadamente na medicina, através da ministração de medicamentos, na biologia, mas também em processos como a catálise no fabrico de diversos produtos (Rad et al., 2011). Um dos

pré requisitos básicos do uso de nanopartículas de ouro em aplicações biomédicas é que elas não sejam tóxicas e que sejam compatíveis quer para ambientes *in vivo* quer para ambientes *in vitro*. As nanopartículas de ouro podem ser usadas em bio sensores. Elas podem ser funcionalizadas com uma bio molécula de tiol, que apresenta mudança na absorção ótica das nanopartículas de ouro (Rad et al., 2011). Recentemente têm sido utilizadas como agentes antimicrobianos, por exemplo no combate à bactéria *Escherichia coli*. Também tem sido atribuído um papel relevante às nanopartículas de ouro no diagnóstico de cancro e na sua terapia. Elas podem ser usadas no auxílio da terapia fototérmica e na radioterapia, as suas propriedades óticas e eletrônicas podem ser usadas para melhorar o contraste em imagens de moléculas para detecção do cancro em fases iniciais. Foi também desenvolvido um sistema de ministração de medicamentos sem recurso a agulhas, uma técnica que usa nanopartículas de ouro e que permitiu que as vacinas sejam administradas através da pele, aproveitando o facto de pequenas partículas poderem passar através de espaços entre as células, enquanto as grandes não podem. Um dos usos mais eficientes das nanopartículas de ouro nos últimos anos é a detecção e combate ao VIH (Rad et al., 2011).

As nanopartículas de ouro têm também um papel importante no ambiente. Tecnologias à base de nanopartículas de ouro podem ser uma solução para algumas questões ambientais, como métodos de produção mais “verdes”, controlo da poluição e tratamento de água. As nanopartículas de ouro são usadas para fabricar diversos catalisadores, pois o ouro é dos metais mais estáveis e resistente à oxidação. Uma das aplicações importantes das nanopartículas de ouro é na qualidade da água e do ar, uma vez que as nanopartículas de ouro permitem a oxidação do monóxido de carbono a dióxido de carbono, transformando assim um gás perigoso numa substância menos tóxica. Também demonstraram ser adsorventes eficientes para a remoção de níveis significativos de mercúrio na água potável (Rad et al., 2011).

As nanopartículas de ouro estão também a ser usadas para aumentar a eletroluminescência e eficiência quântica em díodos emissores de luz. Também são usadas na produção de tintas e pigmentos. Outra aplicação interessante das nanopartículas de ouro é na produção de equipamentos de armazenamento de dados em alta densidade (memórias flash e discos) (Rad et al., 2011).

1.2. Metodologias usadas na caracterização de nanopartículas

Tamanho médio de partícula e distribuição granulométrica - O tamanho das nanopartículas pode ser medido com várias técnicas, dependendo do tamanho médio da partícula. Muitas vezes é recomendada uma combinação de duas ou mais técnicas para obter informações confiáveis. As técnicas mais utilizadas são a difusão de luz e medições por microscopia eletrônica (por exemplo, microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varrimento (SEM)). O microscópio ótico (partículas de tamanho do micron), a microscopia de força atômica (AFM) e o fracionamento hidrodinâmico capilar têm também sido utilizados em diferentes estudos (Peltonen and Hirvonen, 2008). As técnicas de microscopia eletrônica permitem ao mesmo tempo estudar o tamanho e a forma das partículas. Embora as análises baseadas na microscopia eletrônica de transmissão sejam precisas e confiáveis, têm a desvantagem de ser realizada *ex situ*, exigir equipamentos caros e procedimentos de preparação de amostras adicionais. Além disso, porque uma análise típica de TEM examina apenas regiões limitadas da amostra, pode ser difícil determinar propriedades médias de conjunto, como o diâmetro médio ou forma (Liu, 2009). No caso da utilização de SEM é necessário ter especial cuidado para que as etapas de pré-manuseamento da amostra não alterem a natureza das partículas (Peltonen and Hirvonen, 2008). Outra metodologia utilizada na caracterização de nanopartículas é a dispersão dinâmica de luz (DLS) para determinar o raio médio da nanopartícula (Wangoo et al., 2008). Comparados à microscopia eletrônica, os métodos de difusão de luz são rápidos (tempos de medição normalmente de alguns minutos), são precisos e sensíveis. No entanto, se a variação de tamanho for muito grande, a medição é impossível sem pré-manuseamento da amostra, por exemplo, por fracionamento de tamanho antes da medição. A espectroscopia ultravioleta – visível (UV-VIS) pode também ser usada para determinar a presença de nanopartículas em solução e dar informações sobre tamanho, agregação e química de superfície (Ju-Nam and Lead, 2008). O tamanho da partícula afeta a absorção de radiação através de efeitos que são importantes à escala nanométrica. Por exemplo, as nanopartículas de ouro apresentam uma banda de absorção a cerca de 520 nm (Hassellöv et al., 2008). A agregação de nanopartículas resulta no alargamento e no deslocamento da banda de absorção (Hassellöv et al., 2008).

Morfologia das nanopartículas - A agregação de partículas é determinada pela interação entre partículas, dependendo da viscosidade e polarização do fluido. As forças de interação nanopartícula–nanopartícula e as interações fluido–nanopartícula desempenham um papel fundamental no comportamento das nanopartículas ao longo do tempo. As forças de interação, atrativas ou repulsivas, determinam o destino de nanopartículas no ambiente (Gomoll et al., 2000; McManus et al., 2000). Esta interação entre nanopartículas pode levar à formação de agregados e/ou aglomerados que influenciam a morfologia e o comportamento químico e físico das nanopartículas (Akane et al., 1990). Os métodos selecionados para análise da morfologia superficial dependem do tamanho da partícula. As técnicas de microscopia eletrônica e AFM são as técnicas mais utilizadas. Além da morfologia superficial, também a secção transversal e a estrutura interna das partículas podem ser determinadas por SEM. A área de superfície das partículas pode ser medida por adsorção de gás. A maior parte dos estudos de adsorção de gás foi executada com azoto baseada na técnica Brunauer, Emmett e Teller (BET). Resumidamente, no método BET, uma monocamada de azoto líquido é adsorvida na superfície das partículas, e determina-se a quantidade de azoto que é libertada quando essa monocamada é vaporizada (Peltonen and Hirvonen, 2008). A área de superfície da amostra pode ser calculada com base nesta quantidade. O tamanho dos poros na superfície de nanopartículas, distribuições de tamanho de poro e volumes totais dos poros podem também ser obtidos com esta técnica (Salonen et al., 2005).

Composição química e física das nanopartículas - A análise da superfície das nanopartículas pode ser feita por espectroscopia de raios-X. A técnica baseia-se na irradiação de fótons, que causam a emissão de elétrons do material e ionização dos elétrons ao nível do núcleo. Os elétrons são emitidos com energias características do átomo, e os átomos a partir dos quais são emitidos podem ser reconhecidos (Peltonen and Hirvonen, 2008). Devido aos fótons terem baixa energia de penetração, só a superfície pode ser detetada com espectroscopia eletrônica para análise química (ESCA). A calorimetria de varrimento diferencial (DSC) pode ser usada para analisar o comportamento térmico dos materiais: temperatura de transição vítrea, ponto de fusão, ou alterações polimórficas. Para apoiar as interpretações de DSC, análises da forma cristalina amorfa e grau de cristalinidade podem ser feitas por técnicas de difração de raios-X. A análise da composição química pode também ser efetuada por ICP-OES (espectrometria de emissão ótica com fonte indutiva de plasma) após digestão ácida da

amostra. Esta técnica gera informações analíticas a partir do espectro eletromagnético nas regiões do UV, visível e IV próximo. O espectro tem origem nas transições eletrônicas que ocorrem na camada externa de átomos. Para formação do plasma, utilizado na conversão da amostra em átomos, é utilizada uma fonte de alta frequência. O plasma é um gás parcialmente ionizado com elevada temperatura, atingindo 8000 a 10000 K e elevada densidade iônica. Possui energia suficiente para promover a excitação da maioria dos elementos, além de promover a dissociação de compostos com elevada energia de dissociação. O argônio é o gás mais utilizado para formação do plasma, pois além de possuir uma melhor relação custo-benefício, possui um elevado potencial de ionização (15,68 eV) e também uma elevada densidade eletrônica, favorecendo a diminuição da ocorrência de interferências de ionização. A Figura 1 apresenta um esquema geral dos processos de excitação e emissão de radiação que ocorrem no plasma.

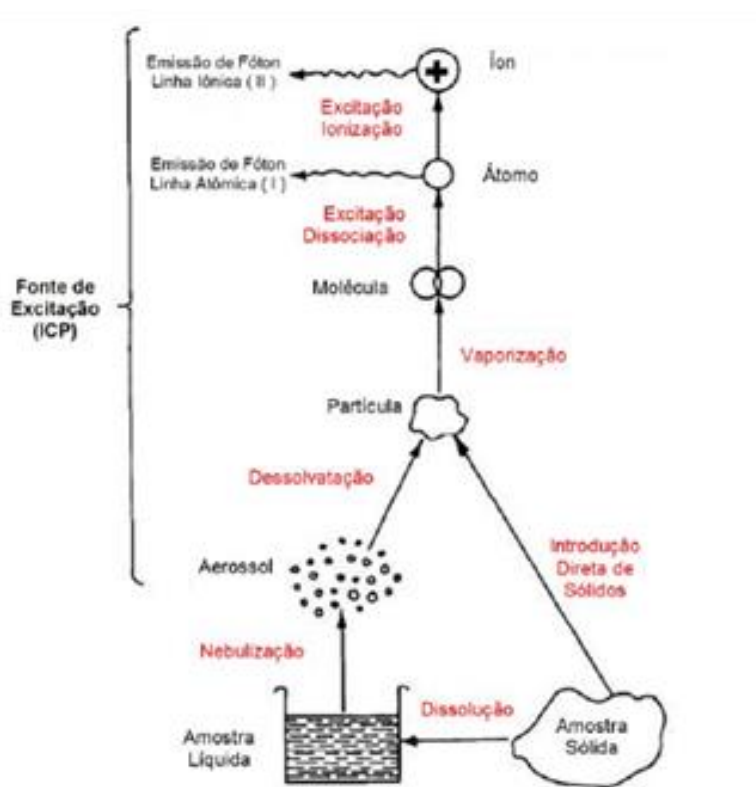


Figura 1 - Esquema dos processos de transformação da amostra no plasma.

A Figura 2 mostra um esquema de como é constituído um equipamento de ICP-OES.

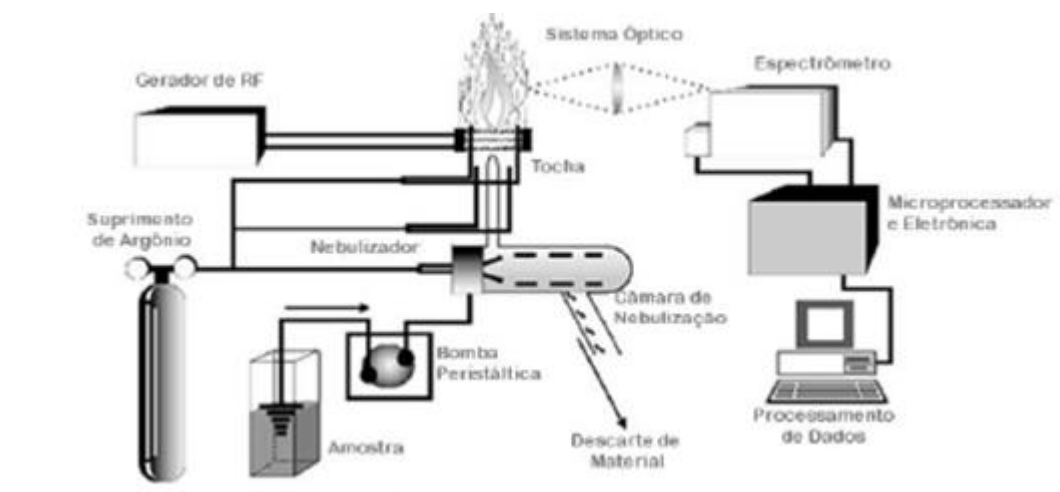


Figura 2 – Esquema geral de um equipamento de ICP-OES.

A técnica de ICP-OES é amplamente usada devido às suas características como análise multielementar, ampla gama linear, baixos limites de detecção (permite quantificar concentrações de metais ao nível de ppb), estabilidade, alta sensibilidade e precisão. A gama linear de trabalho pode ter entre 4 a 6 ordens de grandeza, pois dependendo do elemento e da linha de emissão escolhida podem-se determinar concentrações na gama de $\mu\text{g L}^{-1}$ até g L^{-1} .

Carga de superfície e mobilidade eletroforética - O potencial zeta é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária de líquido ligado à partícula dispersa. O potencial zeta indica o grau de repulsão entre partículas adjacentes, identicamente carregadas numa dispersão. Para partículas que são pequenas o suficiente, um elevado potencial zeta irá conferir estabilidade, ou seja, a solução ou dispersão resistirá à agregação. Quando o potencial é baixo, a atração excede a repulsão, pode ocorrer agregação (Hanaor et al., 2012). A viscosidade ou a natureza do meio podem contribuir para alterar os valores de potencial zeta, assim como a concentração total de iões. Por exemplo, os valores de potencial zeta de nanopartículas de ácido láctico aumentaram 30 mV quando a concentração de NaCl foi alterada de 0,02 para 0,1 mol L^{-1} e diminuiu 50 mV quando o pH foi alterado de 3 para 6 (Hirsjärvi et al., 2006).

1.3. Processos que afetam o comportamento químico e físico no ambiente e as propriedades das nanopartículas

Agregação e aglomeração - A agregação é definida como a associação de partículas primárias por uma ligação forte, enquanto que a aglomeração é definida como a associação por uma ligação fraca causada por forças de Van der Waals (Jiang et al., 2009). No ambiente quer as forças físicas (por exemplo movimento Browniano, gravidade e movimento do fluido) quer as características das nanopartículas (por exemplo, propriedades de superfície, tamanho de partícula) afetarão a aglomeração e agregação de nanopartículas (Farré et al., 2009). Para ocorrer agregação os núcleos das partículas devem entrar em contacto, sendo a taxa de agregação proporcional à probabilidade de colisão entre duas partículas (Rosická et al., 2011). A agregação pode resultar na formação de partículas que são do tamanho suficiente para sedimentar por gravidade. No caso das nanopartículas de ouro, a adição em excesso de um sal à solução de ouro torna a carga de superfície neutra, o que leva à agregação de nanopartículas.

Revestimento da superfície - O revestimento ou não revestimento da superfície das nanopartículas afeta o seu comportamento químico e físico no ambiente. Por exemplo, na ausência de um revestimento de superfície, as nanopartículas à base de metais têm superfícies carregadas resultante da presença de grupos hidroxilo ($-OH$) que podem ligar-se a espécies químicas dissolvidas, tais como iões metálicos e outros ligandos (Guzman et al., 2006). O sinal e magnitude da carga de superfície serão determinados pela química intrínseca dos grupos de superfície e pela composição química da solução, em particular pelo pH e pelas concentrações de iões em solução. O potencial zeta de partículas metálicas ou óxidos metálicos não revestidos, geralmente diminui de valores positivos a pH baixo para valores negativos a pH elevado. A presença de um revestimento de superfície em nanopartículas artificiais, pode modificar a sua química de superfície, em comparação com o equivalente sem revestimento. Por exemplo, foram observadas diferenças no comportamento de diferentes tipos de nanopartículas de prata, umas sem revestimento e as restantes revestidas com diferentes substâncias químicas (El Badawy et al., 2010). A estabilidade dos revestimentos ao longo do tempo é importante para determinar quanto tempo as partículas mantêm as propriedades da superfície que foram “fabricadas”.

Dissolução - Alguns tipos de nanopartículas à base de metais são termodinamicamente instáveis e podem sofrer dissolução química. A dissolução de nanopartículas à base de metais liberta espécies iónicas que podem ser tóxicas. Assim, a taxa de dissolução e a toxicidade relativa de ambas as formas (nanoparticulada e dissolvida) precisam de ser considerados para melhor entender os potenciais riscos das nanopartículas para os organismos e ambiente. Por exemplo, um nanomaterial de óxido de zinco mostrou dissolver-se quase completamente em solos ao longo de nove meses, com formação concomitante de precipitados de zinco (Keller et al., 2010). Noutro estudo, a presença de nanopartículas de ouro de diferentes tamanhos (20 e 55 nm) resultou na dissolução de iões de ouro após 28 dias (Unrine et al., 2010). No entanto, tendo em conta a complexidade destes processos, o número de estudos sobre dissolução de nanopartículas em solos ainda é pequeno.

1.4. Presença de nanopartículas no ambiente

A produção à escala industrial associada a uma ampla variedade de aplicações de nanopartículas fabricadas e à sua possível libertação em quantidades consideráveis para o ambiente (aquático e terrestre) resultaram numa preocupação crescente entre a comunidade científica (Ju-Nam and Lead, 2008). As fontes de emissão de nanopartículas para o ambiente podem ser variadas. Os automóveis podem emitir nanopartículas à base de carbono, como resultado da combustão incompleta. As nanopartículas incluídas em cosméticos, como protetores solares, podem contaminar a água e o solo, contribuindo para sua bioacumulação na cadeia alimentar (EPA, 2007).

As nanopartículas quando libertadas no ambiente interagem com a água, ar e solo. Isso muitas vezes altera as suas propriedades de superfície, o que pode resultar em agregação de partículas ou mudanças na carga de partícula (Handy et al., 2008). É assim importante conhecer as propriedades das nanopartículas e de que forma se encontram no ambiente (Nowack, 2009). Vários estudos recentes focaram-se na análise de potenciais riscos ambientais associados à emissão de nanopartículas para as águas residuais e subsequente bioacumulação de nanopartículas em sistemas naturais (Hannah and Thompson, 2008). Alguns destes estudos, mais relacionados com a temática deste trabalho, são descritos em seguida em maior detalhe.

Presença de nanopartículas no solo - As concentrações da maioria das nanopartículas artificiais no ambiente ainda permanecem desconhecidas, mas a modelização do seu

transporte no ambiente sugere que o solo pode ser o principal depósito e que as concentrações de nanopartículas manipuladas são maiores no solo do que na água ou no ar (Gottschalk et al., 2009). O destino de nanopartículas lançadas no solo pode variar consoante as características físicas e químicas das nanopartículas. As nanopartículas lançadas no solo podem ser fortemente retidas na matriz sólida, tornando-se imóveis. A sorção de qualquer nanopartícula no solo será dependente do seu tamanho, composição química, características de superfície e das condições de aplicação nos solos. As propriedades do solo vão afetar o comportamento e a mobilidade das nanopartículas. Os microrganismos presentes no solo e nas águas subterrâneas podem também interagir com as nanopartículas e alterar a sua mobilidade. Foi estudada a interação de nanopartículas de ouro funcionalizadas com citrato com os microrganismos do solo, *Pseudomonas fluorescens* (aeróbio) e *Clostridium SP.* (anaeróbio) (Fitts et al., 2006) e foram observadas alterações na química da superfície das nanopartículas e no seu comportamento de agregação aquando da exposição às células bacterianas (Fitts et al., 2006); espetromicroscopia de transmissão por varrimento de raio-X revelou que as nanopartículas foram atraídas para a superfície da célula bacteriana e que ocorreram interações célula–nanopartícula. A compreensão dos mecanismos de biotransformação predominantes é necessária para prever o destino e transporte de nanopartículas em estações de tratamento de águas residuais, na sua aplicação em solos agrícolas e potencial lixiviação para águas subterrâneas e superficiais.

As nanopartículas que contêm metais na sua base de composição química possuem características particulares que vão controlar o seu destino, comportamento e ecotoxicidade no ambiente (Tourinho et al., 2012). As nanopartículas à base de metais são frequentemente fabricadas com revestimentos de superfície, que podem modificar o seu comportamento no ambiente. Em comparação com a fração dissolvida, em que o comportamento pode ser entendido em grande parte em termos de estabilidade de partículas *versus* agregação, os solos apresentam uma matriz sólida com que as nanopartículas podem interagir, assim como uma fração aquosa, que pode conter quantidades apreciáveis de material coloidal/particulado. A avaliação da forma de nanopartículas em solos, é dificultada pela relativa falta de procedimentos adequados para a sua caracterização (Hasselöv et al., 2008). Atualmente, a maioria das técnicas de caracterização são limitadas por apenas serem aplicáveis em fase aquosa (Tiede et al., 2009). Embora não existam ainda estudos publicados que evidenciem a deteção de nanopartículas de ouro em solos naturais, há um conjunto recente de estudos onde se

pretende avaliar o comportamento das nanopartículas de ouro no solo. Para tal são adicionadas nanopartículas de ouro ao solo e avaliadas a sua transferência para minhocas e plantas (Unrine et al., 2010, 2012) (Judy et al., 2011, 2012).

Influência das propriedades do solo - Os componentes do solo como as partículas de argila ou substâncias húmicas terão elas próprias superfícies carregadas, que influenciarão a associação de nanopartículas com a fração sólida. Tais componentes do solo podem também formar coloides na fração aquosa, que irão interagir com as nanopartículas. Por exemplo, as substâncias húmicas presentes na fração aquosa podem sorver às superfícies de nanopartículas, e assim influenciar a sua estabilidade em solução. As substâncias húmicas estão carregadas negativamente a pHs ambientais e, portanto, a sua sorção tornará o conglomerado de partículas carregado negativamente (Ghosh et al., 2008). Isso pode aumentar a estabilidade da partícula em solução, reduzindo a agregação e sedimentação (Ben-Moshe et al., 2010). A alteração da carga de superfície pode também diminuir a afinidade de partícula para as membranas celulares e, assim, reduzir a sua biodisponibilidade para sorção por plantas e organismos (Unrine et al., 2008). Todos estes processos são fortemente influenciados por características predominantes do sistema do solo, particularmente o pH e a força iónica da fração aquosa. Um estudo recente mostrou que a taxa de agregação de nanopartículas de TiO_2 em suspensões de solo estava negativamente correlacionada com as características do solo, como o conteúdo de argila e matéria orgânica dissolvida, e positivamente correlacionada com a força iónica, o potencial zeta e o pH (Fang et al., 2009). Estes fatores podem assim afetar a biodisponibilidade de nanopartículas baseadas em metais em solos, assumindo que essa biodisponibilidade está relacionada com a fração de partículas na água dos poros e não com a fração associada com a matriz sólida do solo. Para compreender melhor estes processos são necessários mais estudos sobre o comportamento de nanopartículas em solos em escalas de tempo de meses a anos.

Interações das nanopartículas com as plantas - Apenas alguns estudos estão disponíveis sobre os efeitos das nanopartículas em plantas superiores. A maioria dos estudos aponta para os impactos positivos das nanopartículas no crescimento de plantas, com alguns estudos isolados relativos ao efeito negativo. Numerosos estudos demonstraram que as nanopartículas de TiO_2 promoveram a fotossíntese e o metabolismo do azoto, contribuindo assim para melhorar o crescimento de espinafre,

numa concentração tão baixa quanto 20 mg L⁻¹ (Hong et al., 2005a, b; Yang et al., 2006; Zheng et al., 2005; Lei et al., 2005). Também foi apontado que uma mistura de SiO₂ e TiO₂ em nanoescala poderia aumentar a nitrato redutase, enzima que reduz o nitrato a nitrito, em soja (*Glycine max*), melhorando a sua capacidade de absorção e utilização de água e fertilizantes, estimulando o seu sistema antioxidante, e aparentemente, acelerando a germinação e o crescimento (Lu et al., 2002). No entanto, depois de investigar a fitotoxicidade de pós de alumina em nanoescala com ou sem revestimento de fenantreno, Yang e Watts (2005) concluíram que as partículas de alumina não revestidas inibiam o alongamento da raiz do milho, pepino, soja, couve e cenoura. Este estudo desencadeou a afirmação de que as nanopartículas podem exercer um efeito negativo sobre as plantas (Murashov, 2006). Outro estudo realizado por Lin e Xing (2007) investigou a fitotoxicologia de nanopartículas (nanotubo de carbono de paredes múltiplas, alumínio, alumina, zinco e óxido de zinco) na germinação de sementes e crescimento de raiz de seis espécies de plantas superiores (rabanete, azevém, alface, milho e pepino). A germinação das sementes não foi afetada, exceto para a inibição de zinco em nanoescala em azevém e de óxido de zinco em milho a 2000 mg L⁻¹. Um estudo semelhante realizado por Canas *et al.* (2008) investigou os efeitos de nanotubos de carbono de parede única funcionalizados e não funcionalizados no alongamento da raiz de seis espécies de cultivo (repolho, cenoura, pepino, alface, cebola e tomate). Os nanotubos de carbono não funcionalizados inibiram mais o crescimento da raiz das plantas do que os nanotubos funcionalizados. Noutro estudo, nanopartículas de Cu mostraram-se tóxicas para *Phaseolus radiatus* (feijão-mungo) e *Triticum aestivum* (trigo) (Lee et al., 2008b). O ião de Cu libertado de nanopartículas de Cu teve efeitos insignificantes nas gamas de concentração estudadas, sendo que a toxicidade claramente resultou da presença de nanopartículas de Cu. Resultados semelhantes foram relatados com a aplicação de nanopartículas de sílica, paládio, ouro e cobre numa comunidade microbiana do solo e na germinação de sementes de alface (Shah e Belozeroova, 2009).

1.5. Toxicidade das nanopartículas

Algumas nanopartículas podem modificar as propriedades físico-químicas de um determinado material como por exemplo de tecidos biológicos (Shinde et al., 2012). As nanopartículas são capazes de atravessar membranas biológicas e aceder a células, tecidos e órgãos por inalação ou ingestão, podendo desta forma gerar efeitos biológicos adversos em células vivas (Shinde et al., 2012). Algumas nanopartículas podem

penetrar a pele humana, em particular, a pele morta é uma barreira ineficaz para algumas nanopartículas, sugerindo que o acne, eczemas, feridas feitas ao barbear ou queimaduras solares severas podem acelerar a absorção de partículas na pele (Shinde et al., 2012). Alguns estudos mostraram que algumas nanopartículas são tóxicas para os humanos, uma vez presentes na corrente sanguínea. As nanopartículas no baço, medula óssea e sistema nervoso podem resultar no aumento do *stress* oxidativo, produção de citocinas inflamatórias e morte celular (Shinde et al., 2012). Ao contrário de partículas maiores, as nanopartículas podem ser absorvidas pelas mitocôndrias. Alguns estudos demonstraram o seu potencial para causar mutação do ADN e induzir maior dano estrutural nas mitocôndrias, podendo também resultar na morte celular (Shinde et al., 2012). O tamanho é portanto um fator importante na determinação da potencial toxicidade de uma nanopartícula. No entanto, não é o único fator importante. Outras propriedades de nanopartículas que influenciam a sua toxicidade são: composição química, forma, estrutura superficial, agregação e solubilidade e a presença ou ausência de grupos funcionais. O grande número de variáveis que influenciam a toxicidade traduz-se na dificuldade em generalizar sobre os riscos associados para a saúde com a exposição a nanopartículas (Burleson et al., 2004).

De modo a avaliar os parâmetros toxicológicos, o ponto de partida deve ser a completa compreensão das propriedades do nanomaterial (Burleson et al., 2004). Caso contrário, será difícil atribuir efeitos tóxicos a uma certa propriedade de um material ou até ao próprio nanomaterial sendo que, por exemplo, estes podem ser causados por impurezas (Sayes et al., 2009). Num estudo sobre bioacumulação de nanopartículas de ouro em bivalves foi demonstrado que ouro iónico dissolvido na forma de Au^{3+} é fortemente tóxico. Foram realizados ensaios de exposições de bivalves a nanopartículas de ouro (6 e 30 $\mu\text{g Au L}^{-1}$) e ouro iónico Au^{3+} (50 $\mu\text{g Au L}^{-1}$). As nanopartículas de ouro foram significativamente acumuladas tanto na glândula digestiva como nas guelras após 3 horas de exposição (García-Negrete et al., 2013).

Principais causas da toxicidade de nanopartículas - Foram distinguidas principais causas de toxicidade de nanopartículas após o contacto com células vivas (Kirchner et al., 2005), devido à toxicidade química dos materiais que as constituem: por exemplo, o ião tóxico Cd^{2+} é libertado de nanopartículas de seleneto de cádmio; devido ao seu tamanho reduzido, as nanopartículas podem aderir às membranas celulares e entrar nas células. O acoplamento de nanopartículas às membranas e o armazenamento de

nanopartículas no interior das células pode prejudicar funções celulares, mesmo no caso de nanopartículas quimicamente inertes, que não se decompõem e não reagem com outros componentes da matriz; devido à sua forma, por exemplo, nanotubos de carbono facilmente podem perfurar a membrana celular. As modificações de superfície podem também afetar a agregação e a aglomeração de nanopartículas, o que influencia a sua toxicidade e comportamento no ambiente (Kostarelos et al., 2007). Há estudos que indicam que o principal mecanismo de toxicidade de nanopartículas envolve a produção de radicais livres e espécies reativas de oxigénio (ERO), o que pode resultar em *stress* oxidativo, inflamação e consequente dano em membranas, proteínas e ADN (Shinde et al., 2012). A produção de ERO foi associada a uma gama diversificada de nanomateriais, incluindo fulerenos, nanotubos de carbono e nanopartículas de óxidos metálicos.

Toxicidade das nanopartículas para o Homem - De uma forma geral as nanopartículas podem entrar no corpo humano através da inalação ou contacto dérmico ou secundariamente por injeção ou ingestão, se as nanopartículas estiverem presentes em medicamentos ou alimentos (McAuliffe and Perry, 2007). O tamanho de partículas de aerossóis é conhecido por influenciar a deposição nos pulmões e a translocação potencial para outros órgãos, por exemplo, a fração inalável (que pode entrar nas vias respiratórias), a fração torácica (capacidade de penetração das vias respiratórias, abaixo da laringe, menor do que 10 μm) e a fração respirável (partículas menores que 4 μm) penetram desde as vias aéreas à região de troca de gases do pulmão (Maynard and Aitken, 2007). Foi constatado que após injeção intravenosa as nanopartículas são distribuídas para o cólon, pulmões, medula óssea, fígado, baço e para os vasos linfáticos (El-Ansary and Al-Daihan, 2009). Estudos indicam que quando as nanopartículas são inaladas se distribuem para os pulmões, fígado, coração, baço e cérebro (Shinde et al., 2012). As nanopartículas podem ser eliminadas na região alveolar através da fagocitose. A média do tempo de meia vida de nanopartículas nas vias respiratórias é cerca de 700 dias em seres humanos (Shinde et al., 2012). O contato com nanopartículas através da pele pode ocorrer devido à exposição ocupacional durante o fabrico de solventes, pesticidas ou produtos farmacêuticos. A exposição da pele às nanopartículas também pode ocorrer durante situações não ocupacionais, tais como uso de cosméticos e na aplicação intencional de cremes e outros tratamentos. Foi demonstrado que nanopartículas de óxido de zinco/dióxido de titânio presentes em protetores solares

contribuem para a formação de radicais livres nas células da pele podendo danificar o seu ADN (Dunford et al., 1997). Em alguns casos isto pode resultar em mutações, levando ainda a modificações da estrutura e função das proteínas podendo favorecer o desenvolvimento de tumores e de cancro (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009).

Toxicidade das nanopartículas para as plantas e outros organismos - Embora algumas nanopartículas tenham sido consideradas tóxicas para muitos organismos, em muitos casos pouca coisa se sabe sobre os mecanismos de toxicidade (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009). As células de plantas, algas e fungos possuem paredes celulares que constituem um local principal para a interação e uma barreira para a entrada de nanopartículas. Os mecanismos que permitem que as nanopartículas passem através de paredes celulares e membranas são ainda mal compreendidos (Navarro et al., 2008). Um estudo revelou que nanopartículas contendo zinco e alumínio, exercem efeitos tóxicos na germinação e crescimento das raízes, em plântulas de seis espécies de plantas agrícolas relevantes (Doshi et al., 2008). A biomassa de azevém foi significativamente reduzida, as pontas das raízes encolheram e as células epidérmicas e corticais da raiz foram vacuolizadas ou colapsaram, como resultado da aderência de nanopartículas de ZnO na superfície da raiz (Lin and Xing, 2008). Foi também observada a toxicidade de fulerenos, nanotubos de carbono e dióxido de titânio para um invertebrado aquático, *Daphnia magna* (Baun et al., 2008). O dióxido de titânio num tamanho bastante pequeno (nanoescala) estimulou a produção de ERO no cérebro de alguns organismos e pode danificar neurónios, tal como observado em experiências *in vitro* (Long et al., 2007). As nanopartículas de dióxido de titânio podem exercer efeitos genotóxicos e citotóxicos em células dos peixes. Na presença de nanopartículas magnéticas menores que 10 nm, as células neuronais de alguns peixes deixam de responder a sinais químicos, e em vez de transduzir sinais entram num estado latente (Johnson, 2007). As nanopartículas bio degradadas em ambientes celulares podem acumular-se dentro de células e levar a alterações intracelulares como a destruição da integridade de organelos ou a alterações genéticas (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009). Qualquer entendimento da toxicidade de nanomateriais fabricados deve assim ser olhado para além dos efeitos sobre as células e considerar os efeitos sistémicos em organismos superiores (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009). Tem sido demonstrado que nanopartículas metálicas artificiais com prata são tóxicas para microrganismos de solo (Murata et al., 2005). Estudos indicam que o efeito da prata na atividade de

desidrogenase (uma enzima que indica atividade microbiana oxidativa em solos) no solo foi severo e o crescimento da colônia bacteriana foi inibido para níveis entre 0,1 e 0,5 mg Ag kg⁻¹ de solo (Murata et al., 2005). Além disso, as bactérias desnitrificantes do solo são suscetíveis de inibição pela prata. A concentração de prata nos solos e o tamanho de nanopartículas de prata é crucial para a sua atividade antimicrobiana. Examinando-se a correlação entre a distribuição de tamanho de nanopartículas, a geração de espécies reativas de oxigênio, a acumulação de espécies reativas de oxigênio intracelular e a inibição da nitrificação, observou-se inibição para organismos nitrificantes correlacionada com a fração de prata com menos de 5 nm numa suspensão (Choi et al., 2008). Verificou-se também que este tamanho de nanopartículas artificiais poderia ser mais tóxico para as bactérias do que quaisquer outras frações de nanopartículas ou suas espécies homólogas de tamanho superior (Choi et al., 2008).

1.6. Transferência de nanopartículas na cadeia trófica terrestre

A possível libertação de nanopartículas em quantidades consideráveis para o ambiente (aquático e terrestre) conduziu a uma preocupação crescente relativamente à transferência de nanopartículas ao longo da cadeia trófica (Ju-Nam and Lead, 2008). Judy *et al.* (2011) usaram a planta, *Nicotiana tabacum* L. cv *Xanthi* e a lagarta *Manduca sexta* para investigar o potencial de transferência trófica de nanopartículas de ouro de 5, 10 e 15 nm de diâmetro e a absorção pelas plantas. Os resultados demonstraram transferência trófica e bioamplificação de nanopartículas de ouro de um produtor primário para um consumidor primário da ordem de: 6,2, 11,6 e 9,6 para os tratamentos de 5, 10 e 15 nm, respetivamente. Este resultado tem implicações importantes para os riscos associados com a manipulação destas nanopartículas, incluindo o potencial de exposição humana (Judy et al., 2011). Recentemente desenvolveram outro trabalho em que pretenderam investigar o potencial de bioacumulação e eliminação de nanomateriais artificiais assim como o potencial de toxicidade por lagartas (*Manduca sexta*) resultante da ingestão de superfície de tecido de plantas contaminadas com os nanomateriais. Através deste estudo foi demonstrado que existe um potencial para os consumidores terrestres secundários de bioacumulação de nanomateriais artificiais via exposição trófica indireta e que as lagartas bio acumulam massas menores de nanomateriais artificiais através do consumo dietético de tecidos vegetais contaminados do que através do consumo trófico (plantas que absorvem nanomateriais artificiais) (Judy et al., 2012a). Em outro estudo Judy *et al.* (2012) investigaram a absorção de nanomateriais de

ouro revestidos com tanato (NM-T) ou citrato (NM-C) com 10, 30 e 50 nm diâmetro por parte de plantas *Nicotiana tabacum* L. cv *Xanthi* (tabaco) e *Triticum aestivum* (trigo). Os resultados obtidos mostram que tanto os NMs-C como os NMs-T bioacumularam no tabaco, mas nenhuma bioacumulação de NMs foi observada para qualquer tratamento no trigo. Estes resultados fornecem informações acerca do papel dos poros da parede celular na absorção de plantas para a bioacumulação de NMs, e do movimento do nanomateriais através dos poros da parede celular para serem absorvidos (Judy et al., 2012b).

Unrine *et al.* (2010a) investigaram o papel do tamanho das partículas na oxidação, biodisponibilidade e efeitos adversos de nanopartículas de cobre em solos, através da exposição de minhocas *Eisenia fetida* para uma série de concentrações de nanopartículas em meios artificiais de solo e foi observado que para concentrações de exposição de nanopartículas de cobre até 65 mg kg⁻¹ não se observaram efeitos adversos ecologicamente relevantes. De modo a determinar se as nanopartículas de ouro poderiam ser transferidas do solo para invertebrados e, em seguida, para os consumidores secundários, num outro estudo Unrine *et al.* (2012b) examinaram a transferência trófica de nanopartículas de ouro ao longo de uma cadeia alimentar terrestre simulada. Minhocas (*Eisenia fetida*) expostas a nanopartículas de ouro em solo artificial que serviram de alimento para Rãs-touro-americana juvenis (*Rana catesbeina*). Um segundo grupo de rãs-touro foi exposto a doses equivalentes de nanopartículas de ouro por sonda gástrica oral para comparar a biodisponibilidade de nanopartículas através de exposição direta relativamente à exposição trófica. Estes autores observaram a acumulação de ouro no fígado, nos rins, baço, músculo, estômago e intestino em ambos os grupos de tratamento. A dose total assimilada apresentou em média valores de apenas 0,09% da dose administrada para exposição direta (sonda gástrica oral), mas foi de 0,12% para a exposição trófica. Estes resultados sugerem que as nanopartículas fabricadas presentes no solo podem ser sorvidas em cadeias alimentares e transferidas para consumidores de ordem superiores. Foi realizada uma outra investigação sobre a biodisponibilidade de nanopartículas de ouro em ecossistemas do solo em que o objeto de estudo foram minhocas *Eisenia fétida*, que foram expostas a nanopartículas de ouro de 20 e 55 nm (Unrine et al., 2010b). Os autores observaram que o tamanho de partícula primário (20 ou 55 nm) não influenciou de uma forma consistente as concentrações de ouro acumuladas numa base de concentração mássica. As diferenças de biodisponibilidade entre os tratamentos foram explicadas pelo comportamento de

agregação das nanopartículas na água dos poros. Os resultados sugerem que nanopartículas presentes no solo resultantes de atividades antropogênicas têm o potencial para entrar em cadeias tróficas terrestres (Unrine et al., 2010b).

1.7. Objetivos

Este trabalho focou-se na caracterização do tamanho, da agregação, da morfologia, da composição química e da estrutura de nanopartículas de ouro para avaliação do seu comportamento físico-químico em matrizes naturais, tais como matrizes “solo” e “solução do solo”.

Um primeiro objetivo do trabalho foi avaliar se ocorre transferência das nanopartículas de ouro adicionadas ao solo para a solução de solo e se essa transferência é afetada pela concentração inicial de nanopartículas na suspensão adicionada.

O segundo objetivo deste trabalho foi avaliar a possível influência dos constituintes do solo na transferência de nanopartículas de ouro para a solução do solo. Em particular, foi avaliada a influência das propriedades do solo na transferência solo-solução de nanopartículas, uma vez que esta determinará o potencial de lixiviação das nanopartículas para águas subterrâneas e superficiais assim como o seu comportamento em sistemas terrestres, determinando também a sua toxicidade para plantas e organismos.

Finalmente compararam-se os resultados obtidos na detecção de nanopartículas de ouro na solução do solo bem como a concentração de ouro em solução com valores da literatura que indicam potencial de transferência das nanopartículas de ouro do solo para as plantas, para melhor compreender os riscos associados à transferência de nanopartículas em cadeias tróficas terrestres.

Capítulo 2

Material e métodos

2. Material e métodos

2.1. Síntese das nanopartículas de ouro

A síntese de nanopartículas de ouro foi efetuada de acordo com Schneider et al. (2006). Num balão de fundo redondo de 1 L equipado com um condensador, foram levados à ebulição 100 mL de solução de ácido tetracloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 mmol L^{-1}) com agitação vigorosa (Figura 3 e 4). Depois foram adicionados rapidamente 10 mL de solução de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ 38,8 mmol L^{-1}). A solução mudou de cor após alguns minutos, de amarelo para preto e depois para roxo. Após 1 hora o aquecimento foi desligado e a agitação foi mantida durante pelo menos 12 horas. Após este período, a suspensão de nanopartículas de ouro foi armazenada e mantida no escuro a uma temperatura de 5°C.

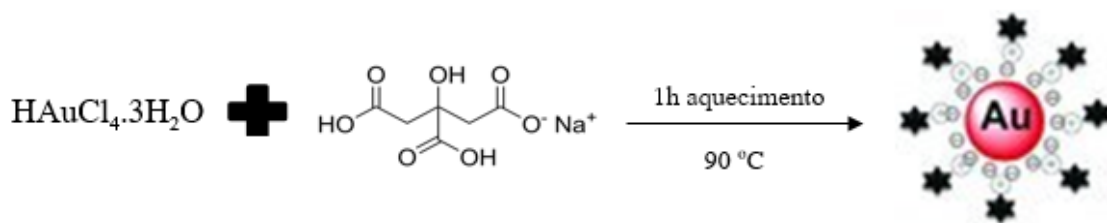


Figura 3 – Esquema representativo da síntese de nanopartículas de ouro.



Figura 4 – Imagem da montagem experimental usada na síntese de nanopartículas de ouro.

2.2. Procedimento experimental

Inicialmente foi realizada uma experiência em que se pretendeu avaliar se há transferência de ouro do solo para a solução do solo e se a concentração inicial afeta esta transferência – **1ª experiência**. Para isso foram preparadas três suspensões de nanopartículas com diferentes concentrações de ouro (Au) - 16 mg L^{-1} , $8,5 \text{ mg L}^{-1}$ e $3,6 \text{ mg L}^{-1}$ Au (suspensão A, B, C).

Na montagem experimental foi colocado 1 kg de solo em vasos de plástico. O solo usado foi recolhido na zona industrial de Estarreja no âmbito de um estudo anterior (Rodrigues et al., 2010). Este solo foi seco ao ar e crivado a $<2 \text{ mm}$. Foram também previamente determinados valores de pH do solo, carbono orgânico, percentagem de argilas, concentração de óxidos amorfos de ferro (Fe) e alumínio (Al), capacidade de retenção de água bem como concentração pseudo-total de elementos químicos (Rodrigues et al., 2010). De seguida foram colocados dois amostradores para recolher a solução do solo, um junto à superfície e outro no fundo do vaso, devidamente tapados por solo (Figura 5). Foram usados amostradores de solução de solo do tipo “Rhizon flex” (Figuras 6 e 7). Estes amostradores, também denominados por raízes artificiais, têm uma extremidade porosa funcionando como um filtro que é constituída por um tubo fino de um polímero poroso hidrofílico onde os poros têm um tamanho médio de $0,15 \text{ }\mu\text{m}$. Para a recolha das soluções do solo os amostradores têm um fecho “Luer Lock”(“L-L”), que é conectado a um tubo em vácuo de 10 mL . Foram depois adicionados 300 mL de suspensão de nanopartículas de ouro aos vasos, o que corresponde a cerca de 70% da capacidade de retenção de água do solo. Foram sempre preparadas três réplicas de cada vaso com adição de suspensão de nanopartículas. Foram também efetuados “brancos”, em que em vez da suspensão de nanopartículas de ouro foram adicionados 300 mL de água destilada. As amostras de solução de solo foram recolhidas ao longo de 120 dias com periodicidade variável, nomeadamente. Com o intuito de avaliar a retenção de nanopartículas de ouro nos amostradores de solução de solo, efetuou-se uma experiência colocando amostradores submersos numa suspensão de nanopartículas de ouro em três erlenmeyers. Foram feitas recolhas ao longo de 2 dias.

Posteriormente foi realizada uma outra experiência – **2ª experiência** - em que se pretendeu avaliar o efeito da adição da suspensão de nanopartículas de ouro A a diferentes tipos de solo. Para isso foram usados 8 solos (denominados Aljustrel 7, Aljustrel 5, Lousal 2, Lousal 21, Lousal 22, Estarreja 5A, Estarreja 11A e Estarreja

12A) sendo que para cada solo foi efetuado também o respectivo “branco”. Foram igualmente realizadas três réplicas para cada solo. Primeiro foram adicionadas 250 g de solo a um vaso e de seguida foram colocados 2 amostradores para recolher a solução de solo, um à superfície e outro no fundo do vaso. Depois, foram adicionados 70 mL de suspensão de nanopartículas de ouro aos vasos. No caso dos “brancos”, em vez da solução foram adicionados 70 mL de água destilada. As amostras de solução de solo foram recolhidas ao longo de 43 dias, para os seguintes tempos: 24, 48 e 72 horas, ao 8º, 10º e 15º dia. A partir do 15º dia as amostras foram recolhidas de 7 em 7 dias até ao final da experiência. Houve uma diminuição do tempo de recolha das amostras no caso da experiência 2, pois verificou-se que ao fim deste período o pH e a condutividade da solução do solo estavam estabilizados.

O volume de solução de solo recolhido nas experiências foi de cerca de 10 mL em cada amostrador.



Figura 5 – Vaso contendo solo e os amostradores para recolha da solução de solo.

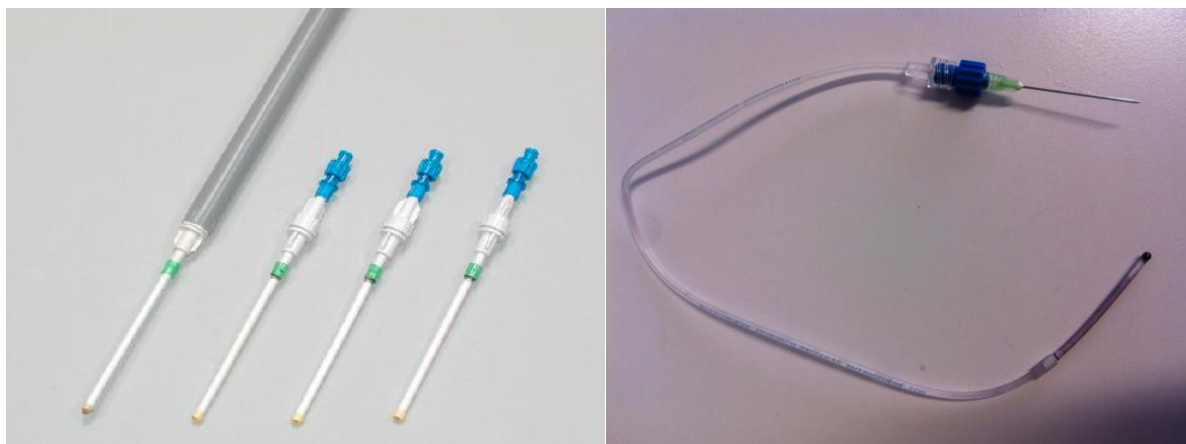


Figura 6 – Amostrador para recolha da solução de solo.

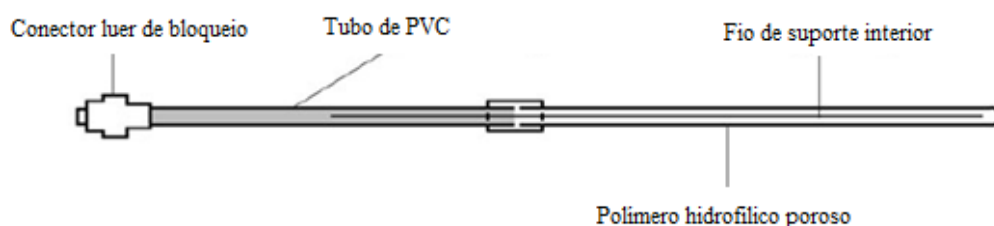


Figura 7 – Esquema sobre a constituição do amostrador.

2.3. Caracterização da suspensão de nanopartículas de ouro

Espetroscopia de UV-VIS - Os espectros de adsorção de UV-VIS das suspensões de nanopartículas de ouro foram efetuados num espectrofotómetro Jasco V-560 de feixe duplo, operando a uma resolução de 1 nm, na gama de comprimentos de onda 350-800 nm. Para as leituras foram utilizadas células de quartzo com percurso ótico de 1 cm e a solução de solo sem a suspensão de nanopartículas foi usada como referência.

Microscopia eletrónica de transmissão (TEM) - A morfologia das nanopartículas foi investigada por microscopia eletrónica de transmissão (TEM) usando o microscópio da marca Hitachi H-9000 a operar a 300 kV. A preparação das amostra para TEM, consistiu em colocar uma alíquota da suspensão de nanopartículas diluída em água milli-Q sobre uma grelha de cobre revestida com um filme de carbono, ilustrada na Figura 8, e deixando secar o solvente à temperatura ambiente, antes da análise.

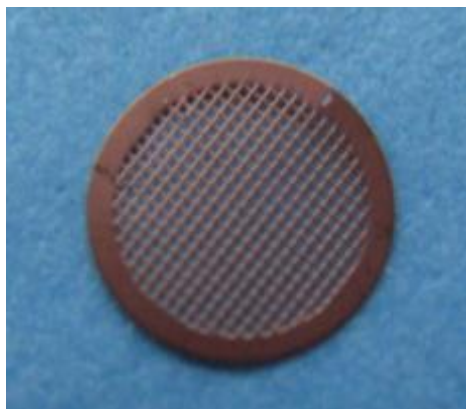


Figura 8 – Grelha de cobre usada para a preparação de amostras para análise por TEM.

Potencial zeta - A medição do potencial zeta das suspensões de nanopartículas de ouro foi realizada usando um ZetaSizer Nano ZS modelo Zen3500 da Malvern. O potencial Zeta é medido através da aplicação de um campo elétrico à dispersão. As partículas dentro da dispersão com um potencial zeta irão migrar para o eletrodo de carga oposta, com uma velocidade proporcional à magnitude do potencial zeta.

2.4. Propriedades da solução de solo

Os parâmetros avaliados para as soluções de solo foram o pH e a condutividade.

Determinação do pH - O medidor de pH foi calibrado de acordo com o manual do aparelho (pH WTW 330i; os tampões usados foram de pH 7.0 e 4.0). Agitou-se a solução de solo vigorosamente antes da medição do pH. Mediu-se o pH da solução após estabilização do valor. Para cada amostra foram efetuadas duas medições.

Determinação da condutividade - O medidor de condutividade utilizado foi um WTW Cond 330i. Procedeu-se à leitura da amostra mergulhando a sonda num tubo contendo a solução de solo. Para cada amostra foi efetuada uma medição.

2.5. Quantificação da concentração de ouro na solução de solo

Pipetou-se para cada vaso de micro-ondas 2 mL de solução de solo (obtida através da recolha de amostra usando os amostradores). Em cada ciclo de digestões efetuou-se um branco, designado "branco micro-ondas" no qual se usaram 2 mL de água ultrapura. Seguidamente a cada vaso de micro-ondas foram adicionados 0,5 mL de HNO₃ concentrado e 1,5 mL de HCl concentrado. Após a adição dos ácidos, os vasos de micro-ondas foram fechados e selecionou-se o programa adequado (programa Express

Vegetal do micro-ondas CEM, modelo MARS que consiste num aumento da temperatura até 160°C durante 15 minutos seguido de mais 5 minutos a 160°C) para se proceder à digestão. Após a sua digestão, os vasos foram deixados a arrefecer aproximadamente 25 minutos. Posteriormente transferiu-se a solução digerida para tubos de plástico de 30 mL.

A concentração de ouro presente na solução foi analisada por ICP-OES. Adicionalmente foram também analisadas as concentrações de Fe, Al e Mn em todas as amostras de solução do solo.

2.6. Determinação da fração reativa de ouro no solo

Considerou-se importante avaliar também a reatividade do ouro retido na fração sólida do solo. A concentração total de um metal quando presente no solo inclui uma fração não-reativa (ou inerte) e uma fração reativa, sendo que a última representa a fração de cada metal que está sorvida às componentes sólidas do solo e em equilíbrio com a solução do solo (frequentemente definida como a fração “disponível”) (Rodrigues et al., 2010). A fração reativa inclui precipitados de contaminantes e iões metálicos reversivelmente adsorvidos à superfície de argilas, matéria orgânica e óxidos metálicos. A fração adsorvida de um metal está em equilíbrio com a fração diretamente disponível na solução do solo, que pode ser lixiviada, ser prejudicial para os microrganismos do solo e ser incorporada nas cadeias tróficas. As extrações químicas de solo (em particular a extração do solo com as soluções $0,43 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ e $2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$) podem ser usadas de forma a determinar a fração reativa de metais no solo (Rodrigues et al., 2010). Decidiu-se assim aplicar estas extrações químicas à fração sólida do solo. Todos os solos foram retirados dos vasos, secos à temperatura ambiente até peso constante e homogeneizados antes de se proceder à sua extração química.

Extração de solo com $0,43 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 - A extração com $0,43 \text{ mol L}^{-1}$ de HNO_3 foi realizada com uma proporção 1:10 solo/solução (g/g) (Rodrigues et al., 2010). Para preparação da solução de extração diluíram-se 30 mL de HNO_3 concentrado para 1 L de água destilada. Em seguida pesou-se 5,00 g de amostra e transferiu-se para um frasco de boca larga HDPE (“Highdensity polyethylene”). Adicionou-se 50,0 mL de solução de extração. Agitou-se mecanicamente durante 2 horas, à temperatura ambiente e os extratos foram filtrados usando filtração por vácuo (unidade de filtração Millipore® e

papel de filtro 0,45 µm). O filtrado foi recolhido num tubo de plástico para análise de metais. Os filtrados foram mantidos a 4°C até serem analisados.

Extração de solo com 2 mol L⁻¹ de HNO₃ - A extração com 2 mol L⁻¹ de HNO₃ foi realizada com uma proporção 1:10 solo/solução (g/g) (Rodrigues et al., 2010). Para preparação da solução de extração diluíram-se 140 mL de HNO₃ para 1 L de água destilada. Em seguida pesou-se 5,00 g de amostra e transferiu-se para um frasco de boca larga HDPE. Adicionou-se 50,0 mL de solução de extração. Agitou-se mecanicamente durante 2 horas, à temperatura ambiente e os extratos foram filtrados usando filtração por vácuo (unidade de filtração Millipore® e papel de filtro 0,45 µm). O filtrado foi recolhido num tubo de plástico para análise de metais. Os filtrados foram mantidos a 4°C até serem analisados.

2.7. Determinação da fração bio acessível

A fração “bio acessível” representa a fração de um contaminante no solo que está disponível para ser absorvida pelo nosso organismo aquando da ingestão de solo e que, portanto, poderá representar risco para a saúde humana (Madrid et al., 2008). Foi aplicada à fração sólida do solo uma extração química utilizada como teste “*in vitro*” para avaliação da fração de metal que estará disponível para ser absorvida através do sistema digestivo aquando da sua ingestão e assim representar risco para a saúde Humana (Madrid et al., 2008).

Método “SBET” (Simple Bio-accessibility Extraction Test) - dissolveram-se 60,06 g de glicina (C₂H₅NO₂) em 2 L de água destilada (de acordo com o método EPA 9200.1-86, de 1998, “Standard Operating Procedure for an In Vitro Bioaccessibility Assay for Lead in Soil”). Ajustou-se o pH a 1,5 com HCl 12,1 mol/L. Transferiu-se 50,0 mL da solução preparada anteriormente para um frasco de boca larga HDPE e juntou-se 0,500 g de amostra de solo. Os frascos foram colocados numa incubadora (JP Seleta 200D) a 37°C, com agitação orbital a 150 rpm durante 1 hora. No final da agitação filtrou-se (0,45µm) e mediu-se o pH da solução (que após a extração deverá manter-se no intervalo pH=1,5±0,5). Os filtrados foram mantidos a 4°C até serem analisados.

Todas as amostras de solução de solo, assim como as amostras resultantes da extração da fração reativa e bio acessível foram previamente digeridas para determinação da concentração de ouro. A quantificação da concentração de ouro foi efetuada por ICP-OES no Laboratório Central de Análises da Universidade de Aveiro.

O limite de detecção foi calculado de acordo com as recomendações da IUPAC, sendo que o seu valor se situa acima do sinal médio do branco (x_0), a cerca de 3 vezes o desvio-padrão do branco ($LD = x_0 + 3,3 s_0$). No caso do ouro o limite de detecção para o tipo de amostra utilizado é de $0,12 \text{ mg L}^{-1}$.

É importante salientar que todas as amostras de extratos para determinação da concentração de ouro na fração reativa e bio acessível foram também previamente digeridas, tal como descrito para as amostras de solução do solo. A concentração de ouro presente na solução digerida foi analisada por ICP-OES. Foram igualmente analisadas as concentrações de Fe, Al e Mn em todas as amostras.

2.8. Análise estatística dos dados

O SPSS 20.0 para Windows e o Microsoft office Excel 2013 foram os programas utilizados para a análise estatística dos dados. A análise estatística dos dados englobou a realização de análise de variância (fator único) e gráficos de dispersão. A análise de variância foi realizada com o intuito de verificar diferenças significativas entre os valores de pH (e de condutividade) nas amostras de solução recolhidas nos vasos onde foi adicionada a suspensão de nanopartículas e os respetivos brancos, e de verificar diferenças no pH (e condutividade) entre as amostras de superfície comparativamente às de fundo. Relativamente aos gráficos de dispersão, pretendeu-se observar a possível relação existente entre a concentração de ouro existente na solução do solo e as propriedades do solo.

Capítulo 3

Resultados e discussão

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização da suspensão de nanopartículas de ouro

Microscopia eletrónica de transmissão (TEM) - as imagens da Figura 9, representativas da suspensão de nanopartículas de ouro diluída 10 vezes após síntese, e o correspondente histograma (Figura 10), construído com base na medição de 105 partículas usando o programa Image J (desenvolvido no National Institute of Health nos EUA), confirmam a formação de nanopartículas de ouro com tamanho de $17,8 \pm 3,8$ nm. Este valor está de acordo com o tamanho de nanopartículas esperado através da síntese pelo método de redução por citrato, pois de acordo com este método formam-se nanopartículas esféricas com tamanhos entre cerca de 16-147 nm de diâmetro (Daniel and Astruc, 2004), sendo possível controlar o tamanho das nanopartículas através da quantidade de citrato adicionado. O tamanho das nanopartículas de ouro mais comum é de 15-30 nm (Unrine et al., 2012b) (Judy et al., 2012a). De acordo com a literatura, a fração de tamanho mais relevante das nanopartículas em termos ambientais é a inferior a 20 nm (Klaine et al., 2008; Tourinho et al., 2012). Nanopartículas pequenas (<20 nm), devido à sua grande razão área-volume conferem novas propriedades e comportamentos que as torna adequadas para aplicações na área da nanotecnologia (Tourinho et al., 2012).

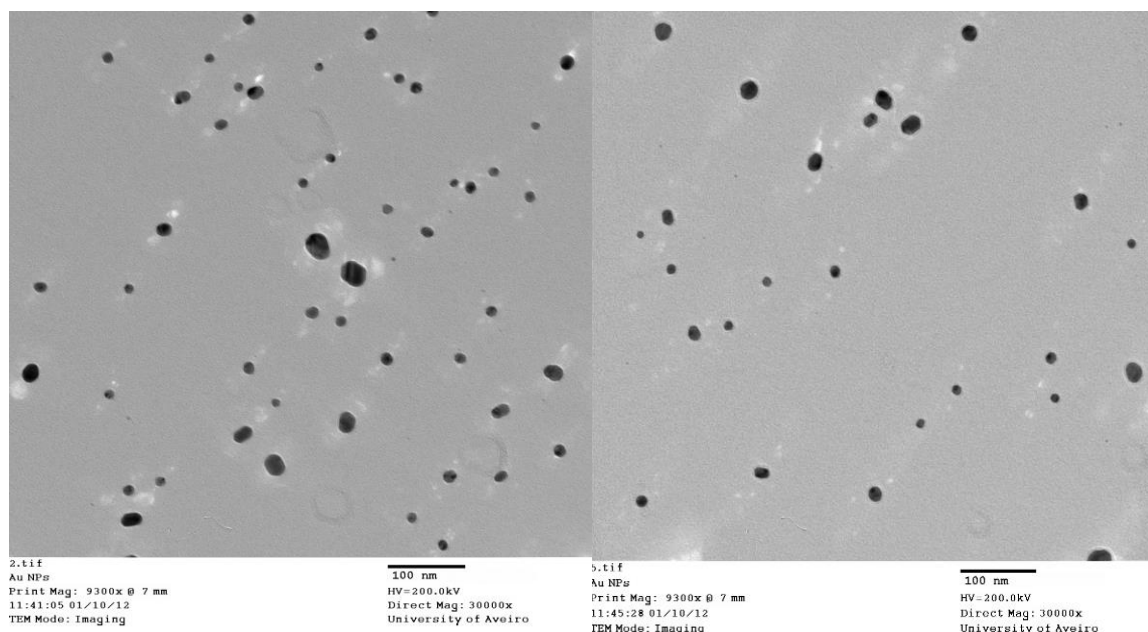


Figura 9 – Imagens da suspensão de nanopartículas de ouro obtida por TEM.

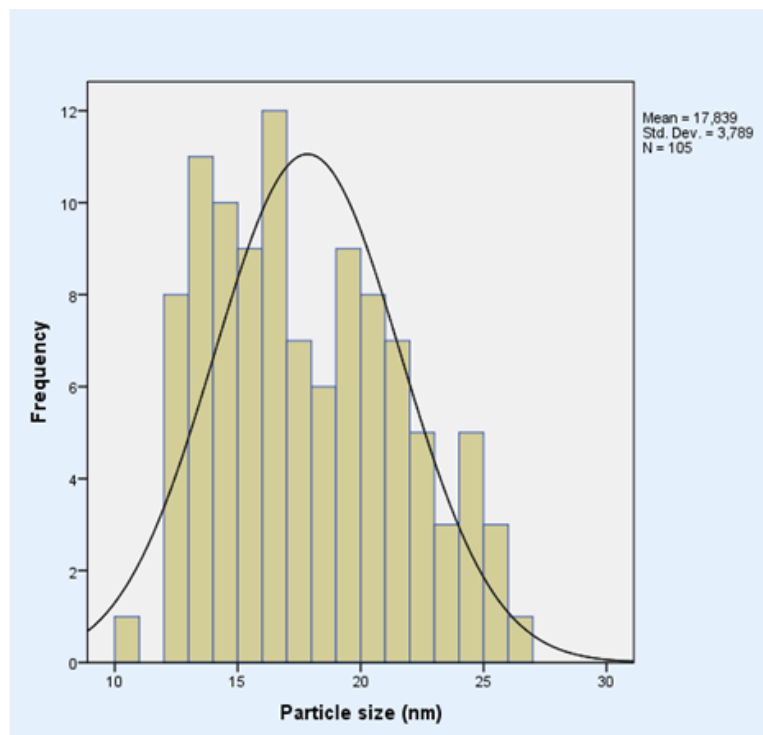


Figura 10 – Histograma do tamanho das nanopartículas de ouro.

Espectroscopia de UV-VIS - O espectro de UV-VIS das suspensões de nanopartículas de ouro é apresentado na Figura 11. As suspensões de nanopartículas de ouro absorvem luz na região do visível, a cerca de 520 nm (vermelho). A posição da banda de absorção característica está centrada a cerca de 522 nm para a suspensão A, a 529 nm para a suspensão B e a 530 nm para a suspensão C, e é concordante com os dados da literatura (Hassellöv et al., 2008). O deslocamento observado está relacionado com uma ligeira variação de tamanho das partículas nas diferentes suspensões. Quanto menor o tamanho da partícula, menor o comprimento de onda da luz absorvida, sendo que a agregação de nanopartículas resulta num alargamento da banda. A agregação de nanopartículas de ouro poderá ocorrer devido a uma diminuição da sua estabilidade na suspensão com a diluição da concentração de citrato em solução (agente estabilizador).

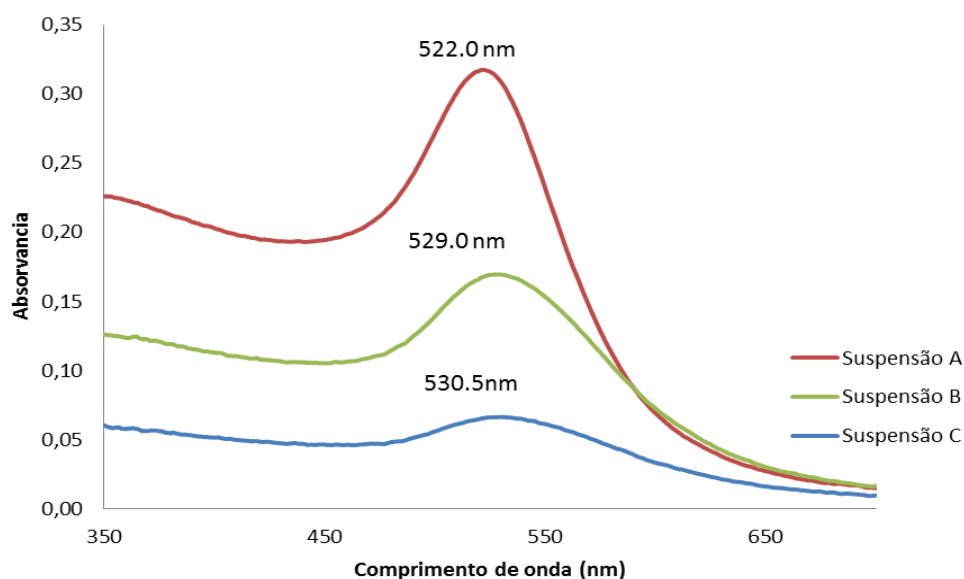


Figura 11 – Espectro de absorvância de UV-VIS das diferentes suspensões de nanopartículas de ouro.

Potencial zeta - Medições de mobilidade eletroforética indicam que as nanopartículas de ouro têm uma carga de superfície negativa associada a um potencial zeta médio de $-42,8 \pm 1,2$ mV ($n = 3$) (Figura 12). Considerando que o potencial zeta reflete a repulsão eletrostática entre partículas e que um valor do potencial zeta igual ou maior que ± 30 mV é associado a valores estáveis (Tourinho et al., 2012), podemos considerar que a esta suspensão de nanopartículas é estável.

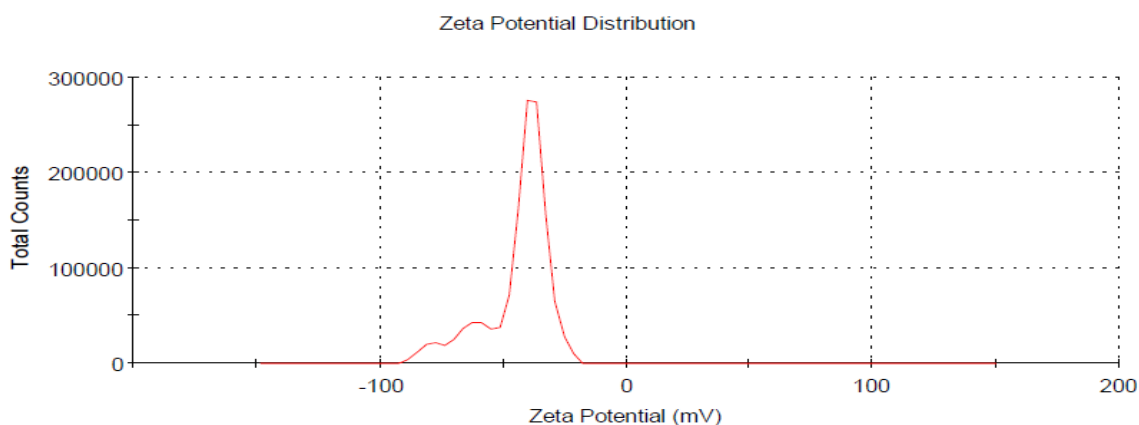


Figura 12 – Potencial zeta da suspensão de nanopartículas de ouro.

Concentração de ouro nas suspensões de nanopartículas - As concentrações de ouro das suspensões A, B e C, determinadas por ICP-OES após digestão ácida, são de 16,1 mg Au L⁻¹, 8,5 mg Au L⁻¹ e 3,6 mg Au L⁻¹ respectivamente.

Teste aos amostradores - Os resultados obtidos no âmbito da avaliação da potencial retenção de ouro nos amostradores da solução de solo são apresentados na Figura 13.

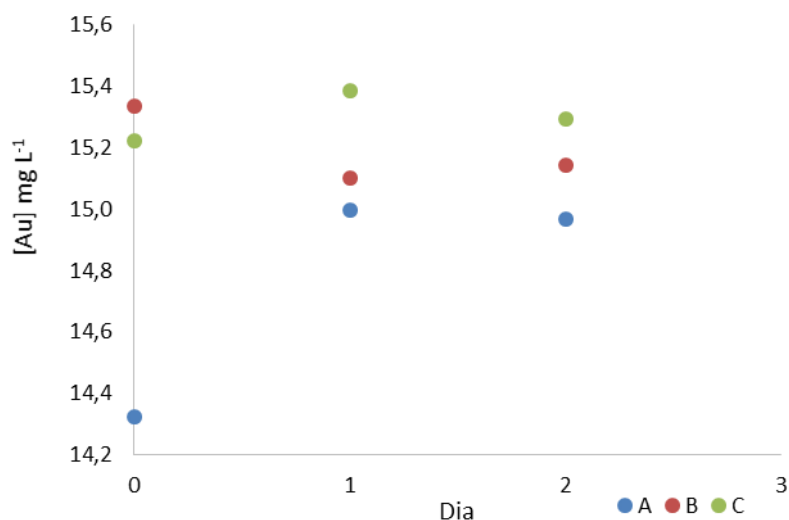


Figura 13 – Concentração de ouro nas amostras de suspensão de nanopartículas após passagem pelos amostradores do tipo “Rhizon Flex”.

A concentração de ouro inicial foi de 15,1 mg L⁻¹ e não se verificou variação relevante de concentração com o tempo. Assume-se assim, que os amostradores não têm influência e não afetam a concentração de ouro na solução de solo.

3.2. Avaliação da transferência solo-solução e efeito da concentração inicial de ouro nessa transferência – Experiência 1

Nos resultados que seguidamente se apresentam, as réplicas 1 a 3 (Rep_1, Rep_2, Rep_3) e respectivos brancos (BR1, BR2, BR3) correspondem à suspensão A, réplicas 4 a 6 (Rep4_, Rep_5, Rep 6) e respectivos brancos (BR4, BR5, BR6) correspondem à suspensão B e as réplicas 7 a 9 (Rep_7, Rep_8, Rep9) e respectivos brancos correspondem à suspensão C.

❖ Espectroscopia de UV-VIS

Nas Figuras 14 a 16 são apresentados os espectros de UV-VIS das três suspensões de nanopartículas ao longo do tempo. Nos vasos onde a suspensão de nanopartículas de ouro de 16 mg Au L⁻¹ foi adicionada aos solos (suspensão A), observou-se um pico aos 522 nm para as 24, 48 e 72 horas, indicando a presença de nanopartículas de ouro na solução do solo. Para suspensões de nanopartículas de ouro mais diluídas (suspensão B

e C) não foi observado a banda de absorção típica na solução do solo para além das 48 horas. Na bibliografia não foi encontrado nenhum estudo referente à análise por UV-VIS de amostras de solução de solo tendo em vista a deteção de nanopartículas metálicas.

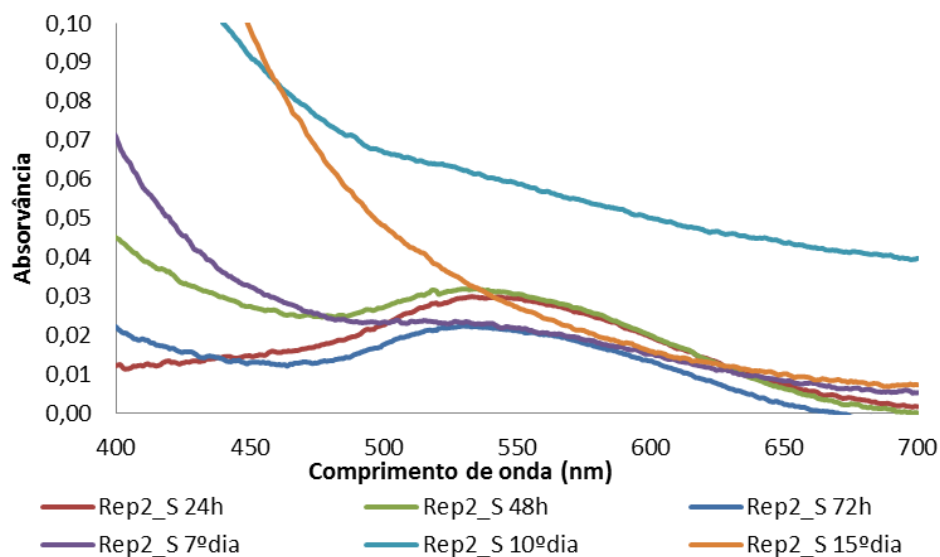


Figura 14 – Espectro de absorvância da suspensão A ao longo do tempo.

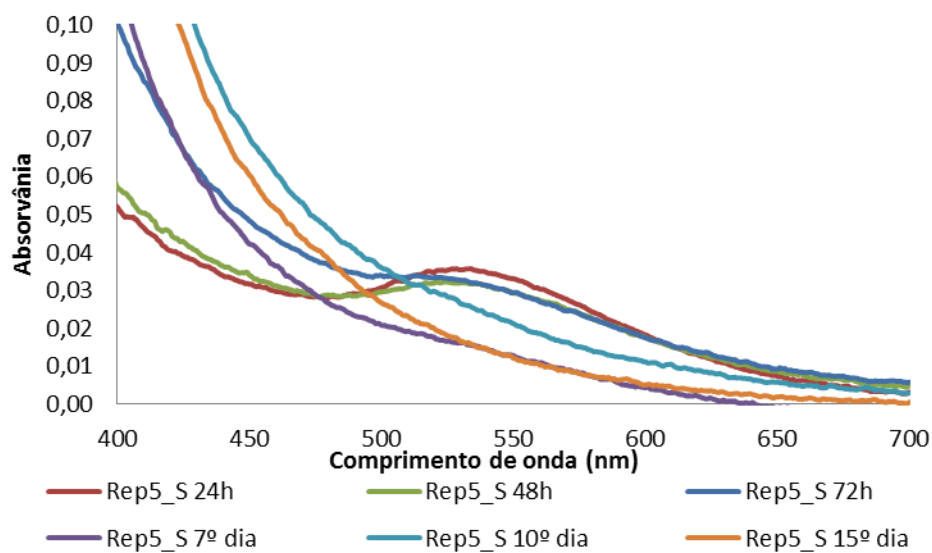


Figura 15 – Espectro de absorvância da suspensão B ao longo do tempo.

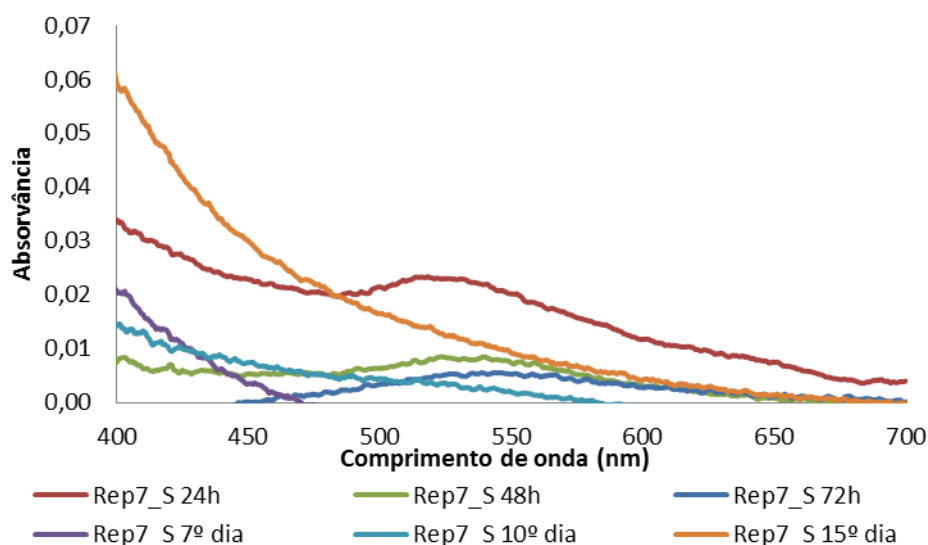


Figura 16 – Espectro de absorvância da suspensão C ao longo do tempo.

Propriedades das soluções de solo

❖ pH

Nas Figuras 17 a 19 encontram-se os valores de pH das soluções de solo ao longo do tempo para a experiência 1. Os valores de pH da solução de solo da suspensão A variaram entre 5,0 e 5,7 para a amostra do vaso contendo nanopartículas e entre 5,2 a 6,0 na sua ausência (branco). Para a suspensão B os valores de pH da solução de solo variaram entre 5,3 e 6,1 para a amostra contendo nanopartículas e entre 5,4 a 6,1 na sua ausência. Na suspensão C os valores de pH variam entre 5,3 e 6,1 para a amostra contendo nanopartículas e entre 5,4 a 6,0 na sua ausência. Desta forma, verifica-se que o pH em todas as soluções de solo recolhidas é portanto ácido. Estes resultados vão de encontro aos valores de pH obtidos para solos agrícolas em Portugal, e em particular na zona de Estarreja onde são predominantemente ácidos (Rodrigues et al., 2010).

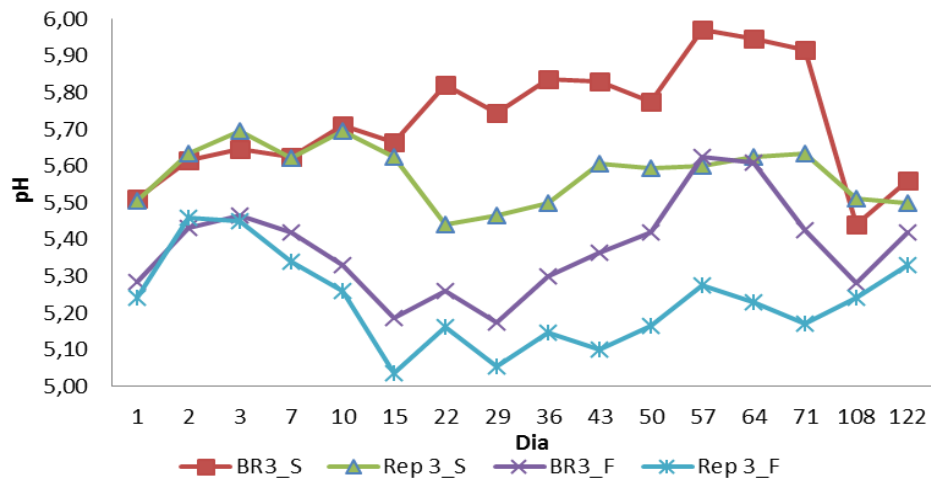


Figura 17 – pH da solução de solo para a suspensão A ao longo do tempo.

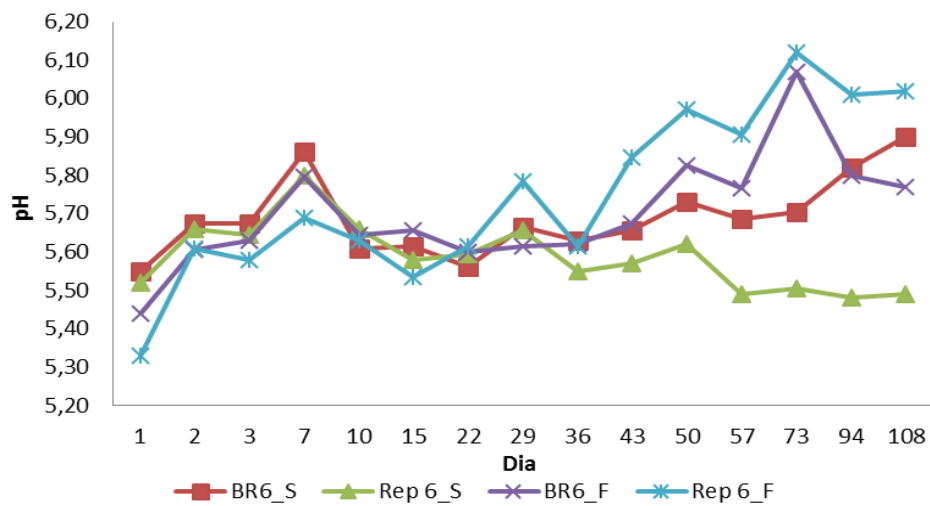


Figura 18 – pH da solução de solo para a suspensão B ao longo do tempo.

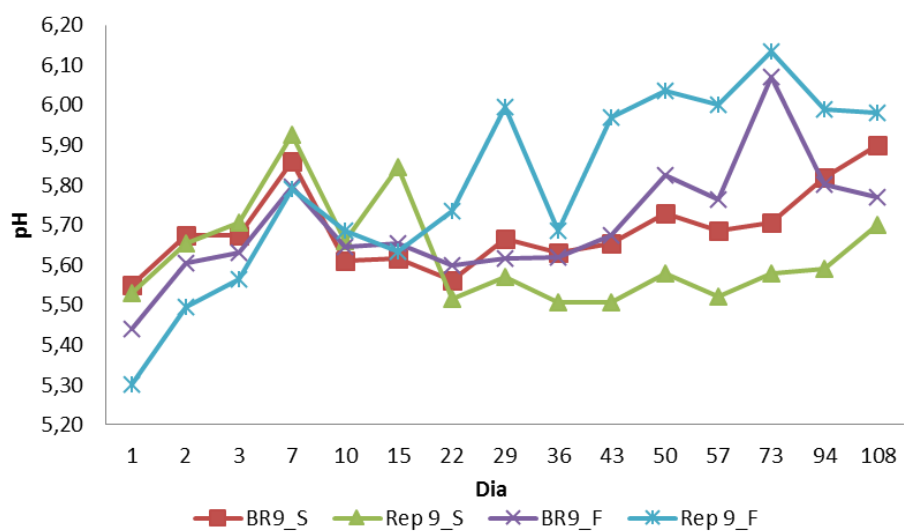


Figura 19 – pH da solução de solo para a suspensão C ao longo do tempo.

Para avaliarmos se a presença das nanopartículas de ouro afeta ou não o pH da solução do solo foram efetuadas análises de variância como os resultados obtidos. A análise tem como objetivo verificar: 1) se existem diferenças significativas entre os valores de pH dos vasos onde foram adicionadas as diferentes suspensões de nanopartículas e os respectivos brancos (quer para as amostras recolhidas à superfície, quer para as amostras recolhidas no fundo); 2) avaliar se existem diferenças no pH obtido nas amostras de superfície comparativamente às de fundo.

Na Tabela 1 encontram-se as análises de variância do pH entre as suspensões A, B e C para as amostras recolhidas à superfície e no fundo do vaso. Para a suspensão A verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,01$) entre o pH da solução do solo recolhido quer à superfície quer no fundo nas amostras com nanopartículas relativamente aos respetivos brancos ($F = 11,2$ e $10,6$, superior a $F_{crítico} = 4,2$). Observou-se que os valores de pH nas amostras dos vasos com nanopartículas foram inferiores aos respetivos brancos. Foram igualmente observadas diferenças significativas ($p < 0,01$) entre o pH da solução recolhida à superfície comparativamente com o fundo ($F = 89,6$, superior a $F_{crítico} = 4,2$). Observou-se que os valores de pH nas amostras de superfície foram inferiores às respetivas amostras de fundo.

Uma possível explicação para estas diferenças poderá estar relacionada com a presença de iões Au^{3+} no solo, dissolvidos a partir das nanopartículas de ouro. O pH da solução de solo é determinado pela presença de iões H^+ em solução (Alloway, 1995) e neste caso, quando se adiciona a suspensão de nanopartículas de ouro ao solo, os iões de Au^{3+} competem com os iões H^+ por lugares de adsorção na fração sólida, resultando numa maior libertação de iões H^+ para a solução e levando assim à diminuição do pH desta. O fato de também ocorrerem diferenças entre as amostras de fundo e de superfície poderá indicar uma maior concentração de iões de ouro à superfície do solo associada a uma maior retenção de nanopartículas à superfície.

No caso da suspensão B, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,01$) entre o pH dos vasos com nanopartículas e os brancos para as amostras de superfície (Tabela 1). Foram igualmente observadas diferenças entre as amostras de superfície e as de fundo ($p < 0,05$). Para a suspensão C verificaram-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o pH da superfície e do fundo, mas não se observaram diferenças entre os vasos com nanopartículas e os respetivos brancos. Estes resultados indicam que a diminuição da concentração de ouro adicionada ao solo traduz-se na redução do seu impacto no pH

do solo comparativamente aos brancos. No entanto, há variação de pH com a profundidade no interior dos vasos.

Tabela 1 – Análise de variância dos resultados para o pH da solução de solo à superfície (S) e no fundo (F) para as amostras (Rep3, Rep6, Rep9) recolhidas nos vasos onde foram adicionadas as diferentes suspensões de nanopartículas (suspensão A, B e C). São também apresentados resultados para os valores de pH dos respetivos brancos (BR3, BR6, BR9).

		<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Suspensão A	BR3_S	Entre grupos	0,173313	1	0,173313	11,25247	0,002168	4,170877
	Rep3_S	Dentro de grupos	0,462067	30	0,015402			
		Total	0,63538	31				
	BR3_F	Entre grupos	0,171113	1	0,171113	10,61471	0,002787	4,170877
	Rep3_F	Dentro de grupos	0,483609	30	0,01612			
		Total	0,654722	31				
	Rep3_F	Entre grupos	0,978251	1	0,978251	89,61632	1,61E-10	4,170877
	Rep3_S	Dentro de grupos	0,32748	30	0,010916			
		Total	1,30573	31				
Suspensão B	BR6_S	Entre grupos	0,076508	1	0,076508	8,417328	0,007161	4,195972
	Rep6_S	Dentro de grupos	0,2545	28	0,009089			
		Total	0,331008	29				
	BR6_F	Entre grupos	0,01875	1	0,01875	0,537284	0,469653	4,195972
	Rep6_F	Dentro de grupos	0,977137	28	0,034898			
		Total	0,995887	29				
	Rep6_F	Entre grupos	0,198453	1	0,198453	6,998501	0,013228	4,195972
	Rep6_S	Dentro de grupos	0,793983	28	0,028357			
		Total	0,992437	29				
Suspensão C	BR9_S	Entre grupos	0,030083	1	0,030083	2,28924	0,14148	4,195972
	Rep9_S	Dentro de grupos	0,367953	28	0,013141			
		Total	0,398037	29				
	BR9_F	Entre grupos	0,073508	1	0,073508	1,887198	0,180418	4,195972
	Rep9_F	Dentro de grupos	1,090617	28	0,038951			
		Total	1,164124	29				
	Rep9_F	Entre grupos	0,22707	1	0,22707	6,227697	0,018742	4,195972
	Rep9_S	Dentro de grupos	1,020917	28	0,036461			
		Total	1,247987	29				

❖ Condutividade

Nas Figuras 20 a 22 encontram-se os valores de condutividade das soluções de solo ao longo do tempo. Para a suspensão A os valores de condutividade na solução de solo variam entre 0,39 e 0,72 mS cm⁻¹ no fundo e 0,21 a 0,70 mS cm⁻¹ à superfície do solo na amostra contendo nanopartículas, enquanto que na amostra de solução de solo sem nanopartículas (branco) a condutividade variou entre 0,08 e 0,66 mS cm⁻¹ à superfície e entre 0,09 e 0,49 mS cm⁻¹ no fundo do vaso. Na suspensão B a condutividade na solução de solo contendo nanopartículas varia entre 0,14 e 0,42 mS cm⁻¹ no fundo e 0,16 a 0,24 mS cm⁻¹ à superfície, enquanto que no branco a condutividade varia entre 0,09 e 0,22 mS cm⁻¹ à superfície e de 0,10 a 0,31 mS cm⁻¹ no fundo. No caso da suspensão C os valores de condutividade variam entre 0,14 e 0,44 mS cm⁻¹ no fundo e 0,10 a 0,24 mS cm⁻¹ à superfície na amostra contendo nanopartículas, enquanto que no branco a condutividade varia entre 0,09 mS cm⁻¹ à superfície e 0,10 a 0,31 mS cm⁻¹ no fundo de solo.

A condutividade nas soluções de solo para as três suspensões de nanopartículas apresentou valores médios de 0,41±0,15 mS cm⁻¹ à superfície e 0,53±0,09 mS cm⁻¹ no fundo para a suspensão A, 0,21±0,03 mS cm⁻¹ à superfície e 0,26±0,09 mS cm⁻¹ no fundo para a suspensão B e 0,17±0,05 mS cm⁻¹ à superfície e 0,29±0,08 mS cm⁻¹ no fundo para a suspensão C. A condutividade da solução de solo na suspensão A é superior relativamente às suspensões B e C. Esta situação é devida à maior concentração da suspensão de nanopartículas de ouro presente na suspensão A e que estará associada a uma maior concentração de íons de ouro em solução.

Não foram encontrados valores de condutividade do solo para a zona de Estarreja, no entanto é de notar que estes valores são inferiores aos de condutividade elétrica de solos na região de Évora em que obtiveram valores médios de 0,78±0,02 mS cm⁻¹ a 30 cm de profundidade e 0,56±0,07 mS cm⁻¹ a 80 cm de profundidade numa área onde os solos são mais argilosos e têm um maior teor de carbonatos, sendo no entanto comparáveis com outros solos arenosos (Serrano et al., 2010).

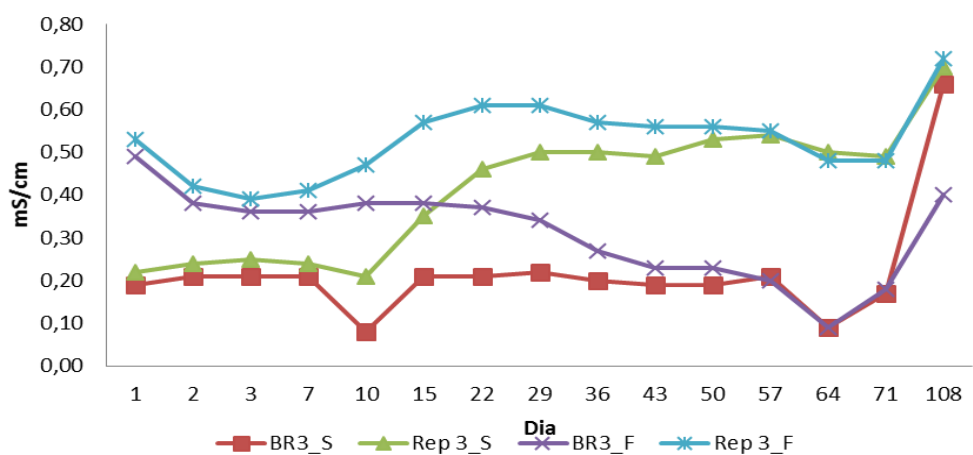


Figura 20 – Condutividade da solução de solo para a suspensão A ao longo do tempo.

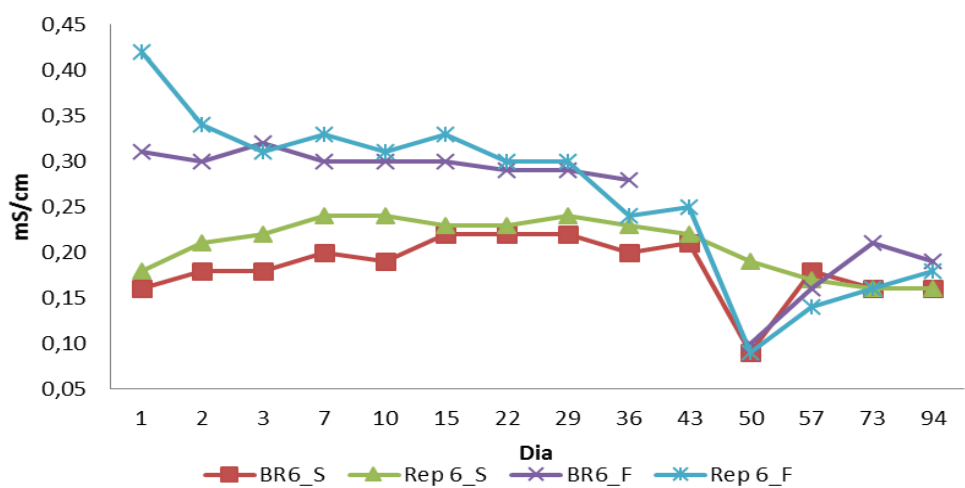


Figura 21 – Condutividade da solução de solo para a suspensão B ao longo do tempo.

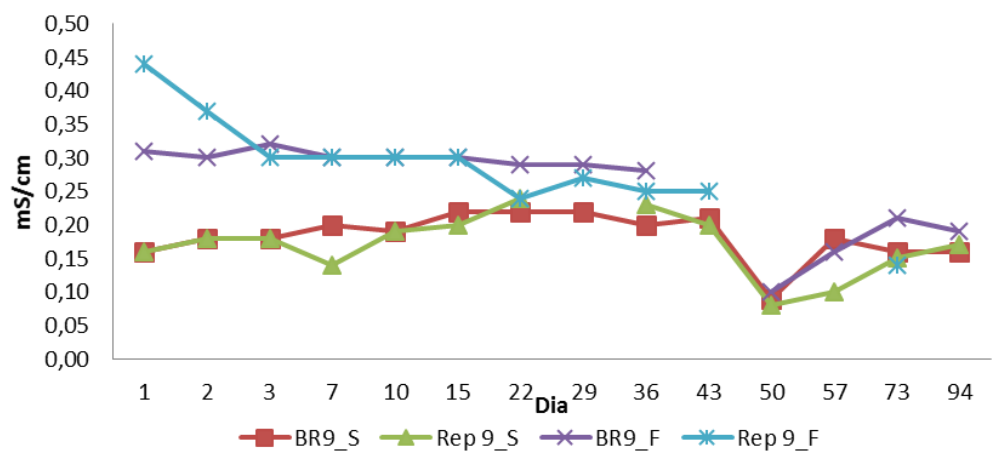


Figura 22 – Condutividade da solução de solo para a suspensão C ao longo do tempo.

Para avaliar se a presença das nanopartículas de ouro afeta ou não a condutividade da solução do solo foram efetuadas análises de variância. Na Tabela 2 encontram-se as análises de variância da condutividade entre as suspensões A, B e C para a superfície e para o fundo do solo. Na suspensão A, para a comparação da condutividade à superfície e no fundo do solo obteve-se um valor de F de 6,39 que é superior ao valor de F crítico que é de 4,19 com um valor de prova inferior a 0,02. O mesmo se verifica para a suspensão B e C, em que os valores de F obtidos são superiores aos valores de F crítico. Conclui-se assim que há diferenças significativas entre a condutividade à superfície e no fundo do solo, sendo que se observou maior condutividade nas amostras de fundo.

Tabela 2 – Análise de variância dos resultados para a condutividade da solução de solo à superfície (S) e no fundo (F) para as amostras (Rep3, Rep6, Rep9) recolhidas nos vasos onde foram adicionadas as diferentes suspensões de nanopartículas (Suspensão A, B e C). São também apresentados resultados para os valores de condutividade dos respetivos brancos (BR3, BR6, BR9).

	<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Suspensão A	BR3_S Entre grupos	0,29403	1	0,29403	14,86323	0,000619	4,195972
	Rep3_S Dentro de grupos	0,553907	28	0,019782			
	Total	0,847937	29				
	BR3_F Entre grupos	0,35643	1	0,35643	37,59432	1,29E-06	4,195972
	Rep3_F Dentro de grupos	0,265467	28	0,009481			
	Total	0,621897	29				
	Rep3_F Entre grupos	0,09747	1	0,09747	6,39527	0,017358	4,195972
	Rep3_S Dentro de grupos	0,426747	28	0,015241			
	Total	0,524217	29				
Suspensão B	BR6_S Entre grupos	0,004375	1	0,004375	4,107557	0,053063	4,225201
	Rep6_S Dentro de grupos	0,027693	26	0,001065			
	Total	0,032068	27				
	BR6_F Entre grupos	0,000293	1	0,000293	0,043718	0,836073	4,241699
	Rep6_F Dentro de grupos	0,167574	25	0,006703			
	Total	0,167867	26				
	Rep6_F Entre grupos	0,021729	1	0,021729	4,633935	0,040802	4,225201
	Rep6_S Dentro de grupos	0,121914	26	0,004689			
	Total	0,143643	27				

Suspensão C	BR9_S	Entre grupos	0,001105	1	0,001105	0,673422	0,419617	4,241699
	Rep9_S	Dentro de grupos	0,041014	25	0,001641			
		Total	0,042119	26				
	BR9_F	Entre grupos	0,005214	1	0,005214	0,993496	0,329727	4,30095
	Rep9_F	Dentro de grupos	0,115449	22	0,005248			
		Total	0,120663	23				
	Rep9_F	Entre grupos	0,080873	1	0,080873	21,40768	0,000131	4,30095
	Rep9_S	Dentro de grupos	0,08311	22	0,003778			
		Total	0,163983	23				

Comparando os valores de condutividade da solução de solo entre as amostras dos vasos contendo nanopartículas e o branco (amostra de solução de solo sem nanopartículas) verifica-se que na suspensão A a condutividade é significativamente ($p < 0,01$) mais alta nos solos com nanopartículas quer no fundo quer à superfície do vaso (Tabela 2). Estes resultados indicam a presença em maior quantidade de iões de Au^{3+} dissolvidos na amostra de solução do vaso onde foram adicionadas nanopartículas de ouro, o que faz com que a condutividade seja superior. Nos casos das suspensões B e C, mais diluídas, os valores de condutividade do branco e da amostra não são significativamente diferentes.

Concentração de ouro presente na solução de solo

Partindo das três suspensões de nanopartículas com concentrações entre 3,6 e 16 mg Au L^{-1} a concentração correspondente de ouro adicionada ao solo foi de 1,1 mg Au Kg^{-1} de solo, 2,6 mg Au kg^{-1} de solo e 4,8 mg Au kg^{-1} de solo, respetivamente. Estes valores são bastante inferiores aos de um estudo sobre bioacumulação de nanopartículas de ouro ao longo de uma cadeia trófica, uma vez que estes autores partiram de uma concentração da suspensão de nanopartículas de 1 g Au L^{-1} e a concentração de ouro adicionada ao solo foi de 500 mg Au kg^{-1} (Unrine et al., 2012b). No entanto, pretendeu-se com este estudo que a quantidade de ouro adicionada ao solo fosse mais próximo daquilo que no futuro poderá ocorrer como níveis de contaminação no ambiente.

Nas Figuras 23 a 25 encontram-se os valores de concentração de ouro nas soluções de solo obtidas na primeira experiência. De notar que se apresentam apenas os resultados das amostras recolhidas à superfície do vaso, uma vez que a concentração de ouro nas amostras de fundo foi sempre inferior ao limite de deteção ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$).

Na suspensão A a réplica 1 apresenta valores de concentração de ouro à superfície de solo entre 0,11 e 0,29 mg L⁻¹. A concentração de ouro diminui ao longo do tempo e a partir do dia 15 já não foi possível quantificar, pois está abaixo do limite de detecção. A réplica 2 tem concentrações de ouro à superfície entre 0,14 e 1,8 mg L⁻¹. A concentração de ouro diminui ao longo do tempo e a partir do dia 15 foi sempre inferior ao limite de detecção.

Na suspensão B a réplica 4 tem concentrações de ouro à superfície na ordem de 0,23 a 2,0 mg L⁻¹. A concentração diminui ao longo do tempo e a partir do dia 15 já não foi possível quantificar. O mesmo se verifica para a réplica 5 cuja concentração de ouro à superfície varia entre 0,20 e 1,7 mg L⁻¹.

Na suspensão C a réplica 7 apresenta valores de concentração entre 0,16 e 0,45 mg L⁻¹. A concentração de ouro diminui ao longo do tempo e a partir do dia 7 já não foi possível quantificá-la. Para a réplica 8 verificam-se valores de concentração de ouro entre 0,24 e 0,82 mg L⁻¹. A concentração diminui com o tempo e a partir do terceiro dia já não foi possível quantificá-la.

Verifica-se assim que a concentração de ouro na solução do solo é menor para as suspensões mais diluídas (B e C) e que esta diminui ao longo do tempo, sendo que a lixiviação de nanopartículas de ouro no solo para a solução do solo ocorre apenas numa fase inicial depois da sua adição aos solos.

A concentração de ouro em todas as amostras de solução de solo onde não foram adicionadas nanopartículas de ouro (branco), está abaixo limite de detecção de 0,12 mg L⁻¹.

A percentagem de ouro na solução do solo nunca ultrapassou os 23,0 %, relativamente à concentração de ouro inicial da suspensão adicionada ao solo. No caso da suspensão A esta percentagem variou entre 12,6 % às 24 horas até 0,8 % no 15º dia. Todos os valores obtidos a partir do 15º dia são inferiores ao limite de detecção do ouro (0,12 mg L⁻¹). Na suspensão B esta percentagem variou entre 21,8 % às 24 horas até 2,5 % ao 10º dia. Nos dias seguintes já não foi possível detetar ouro em solução. Por fim, na suspensão C variou entre 23,0 % às 24 horas até 4,4 % no 7º dia.

De acordo com um estudo realizado por Unrine et al. (2012b), apenas se deteta nanopartículas de ouro ao longo de uma cadeia trófica se o solo apresentar uma concentração de 200 mg Au kg⁻¹, pelo que segundo as concentrações de ouro obtidas neste trabalho é muito pouco provável que ocorra transferência de nanopartículas de

ouro presentes no solo para as plantas e consumidores primários, por exemplo minhocas.

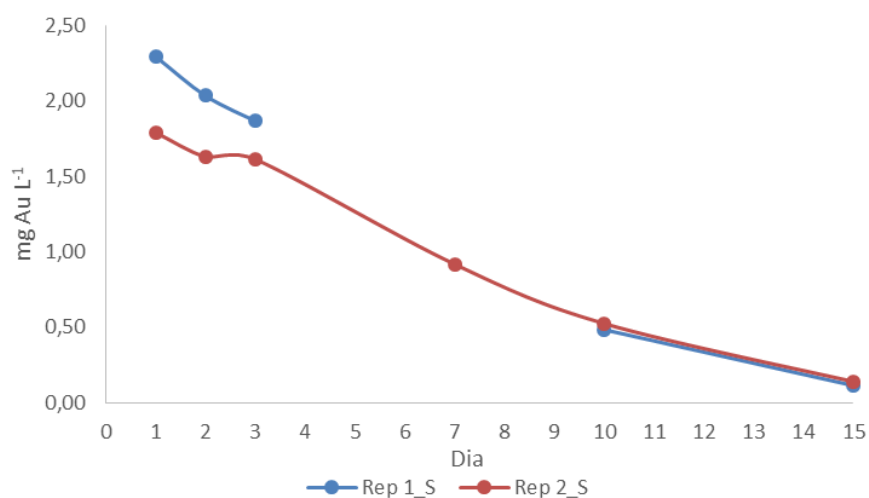


Figura 23 – Concentração de ouro da suspensão A à superfície do solo.

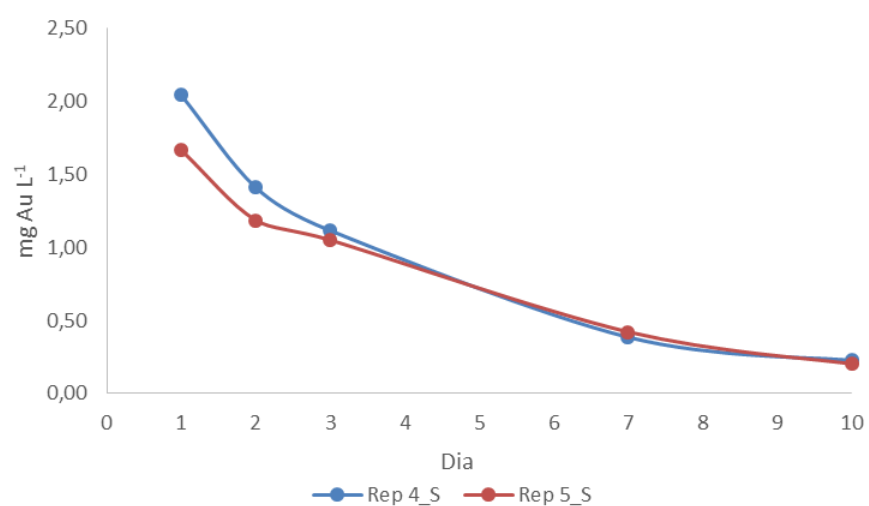


Figura 24 – Concentração de ouro da suspensão B à superfície do solo.

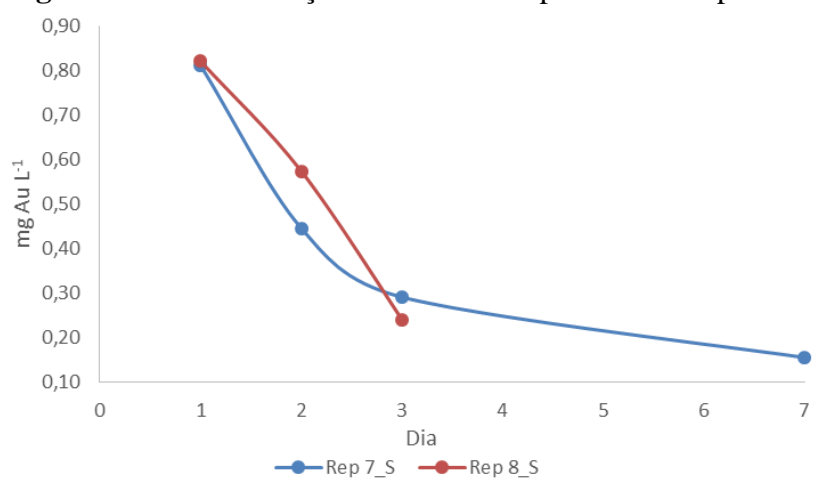


Figura 25 – Concentração de ouro da suspensão C à superfície do solo.

Avaliação da influência das propriedades do solo na transferência solo-solução de nanopartículas de ouro

Com o intuito de avaliar a possível relação existente entre a concentração de ouro existente na solução de solo e as propriedades do solo, tais como pH e condutividade, procedeu-se à realização de gráficos de dispersão para avaliar a correlação existente entre as duas variáveis. Os gráficos de dispersão ([Au] na solução de solo em função do pH e da condutividade) referentes às suspensões A, B e C são apresentados nas Figuras 26, 27 e 28.

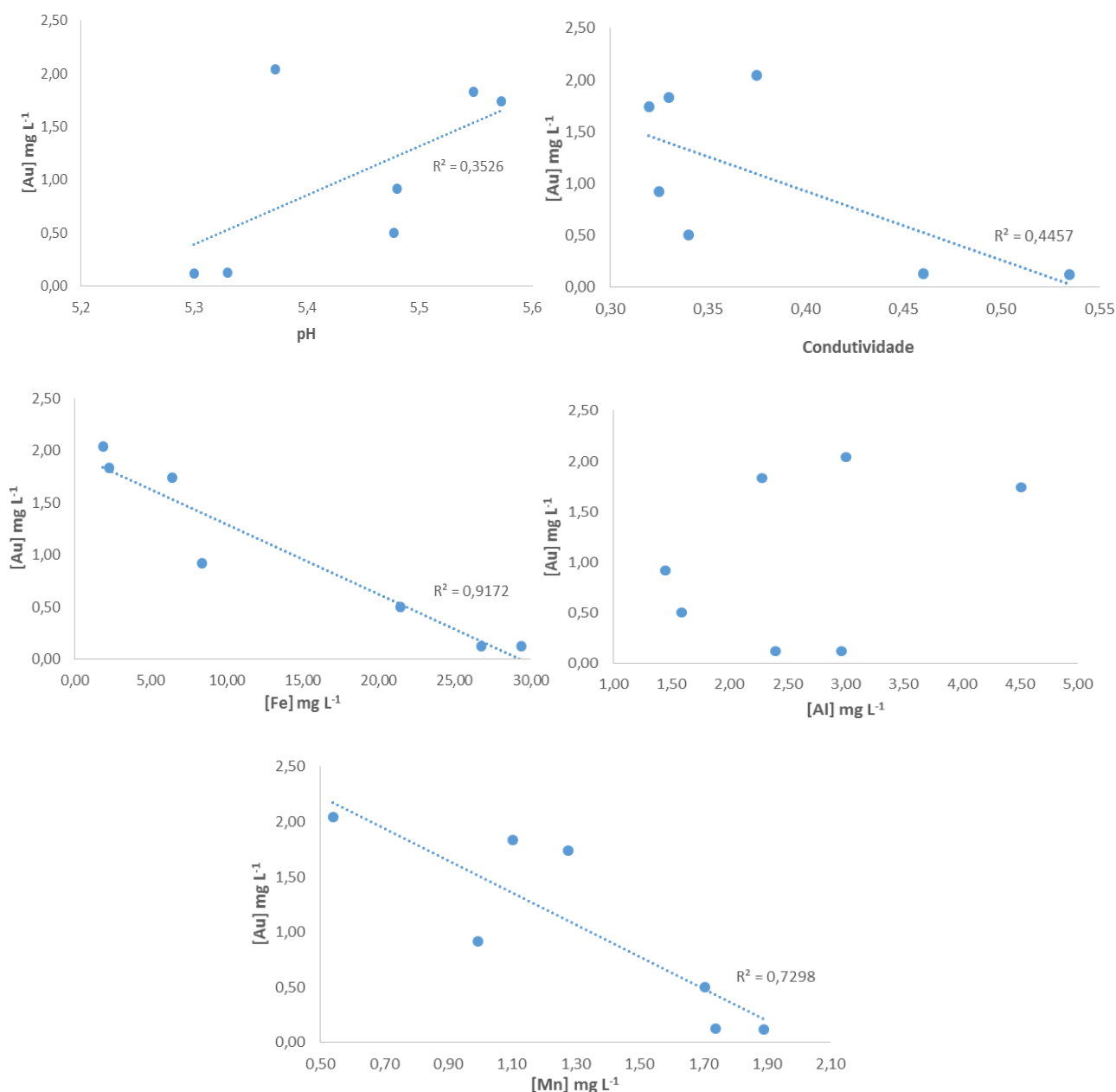


Figura 26 – Gráficos de dispersão que relacionam a concentração de ouro (mg L⁻¹) na solução de solo e as propriedades do solo na suspensão A.

Pela análise da Figura 26 observa-se que existe uma correlação negativa entre a concentração de ouro em solução e a concentração de ferro assim como para a concentração de manganês, isto é, à medida que a concentração de ouro diminui a concentração de ferro e manganês aumenta. Esta correlação é confirmada através dos valores de Pearson obtidos: -1 e -0,9 para o ferro e para o manganês, respectivamente. No caso do alumínio, este apresenta uma fraca correlação com a concentração de ouro.

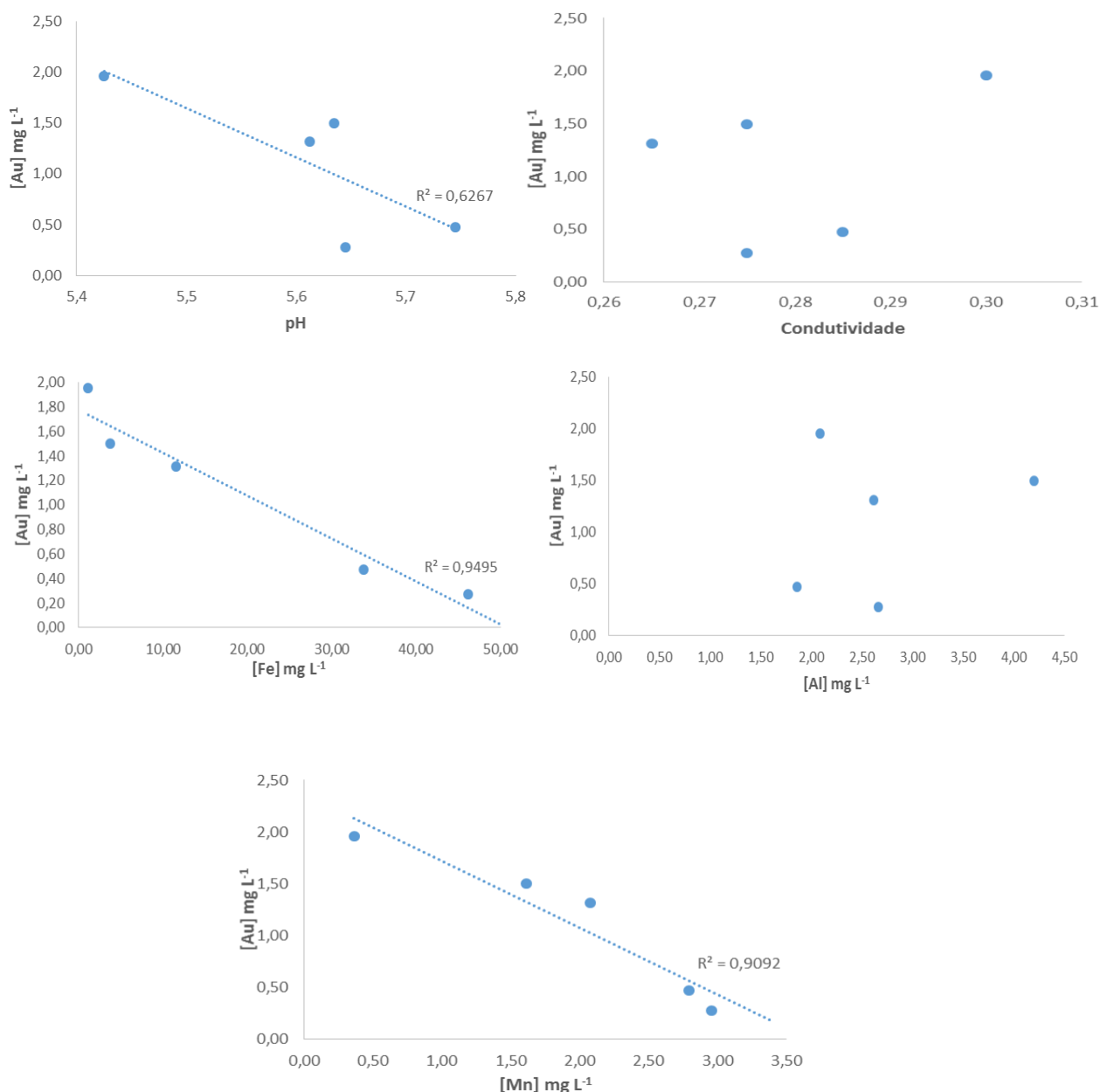


Figura 27 – Gráficos de dispersão que relacionam a concentração de ouro (mg L⁻¹) na solução de solo e as propriedades do solo na suspensão B.

Para a suspensão B observa-se uma correlação entre a concentração de ouro e as concentrações de ferro e manganês em solução.

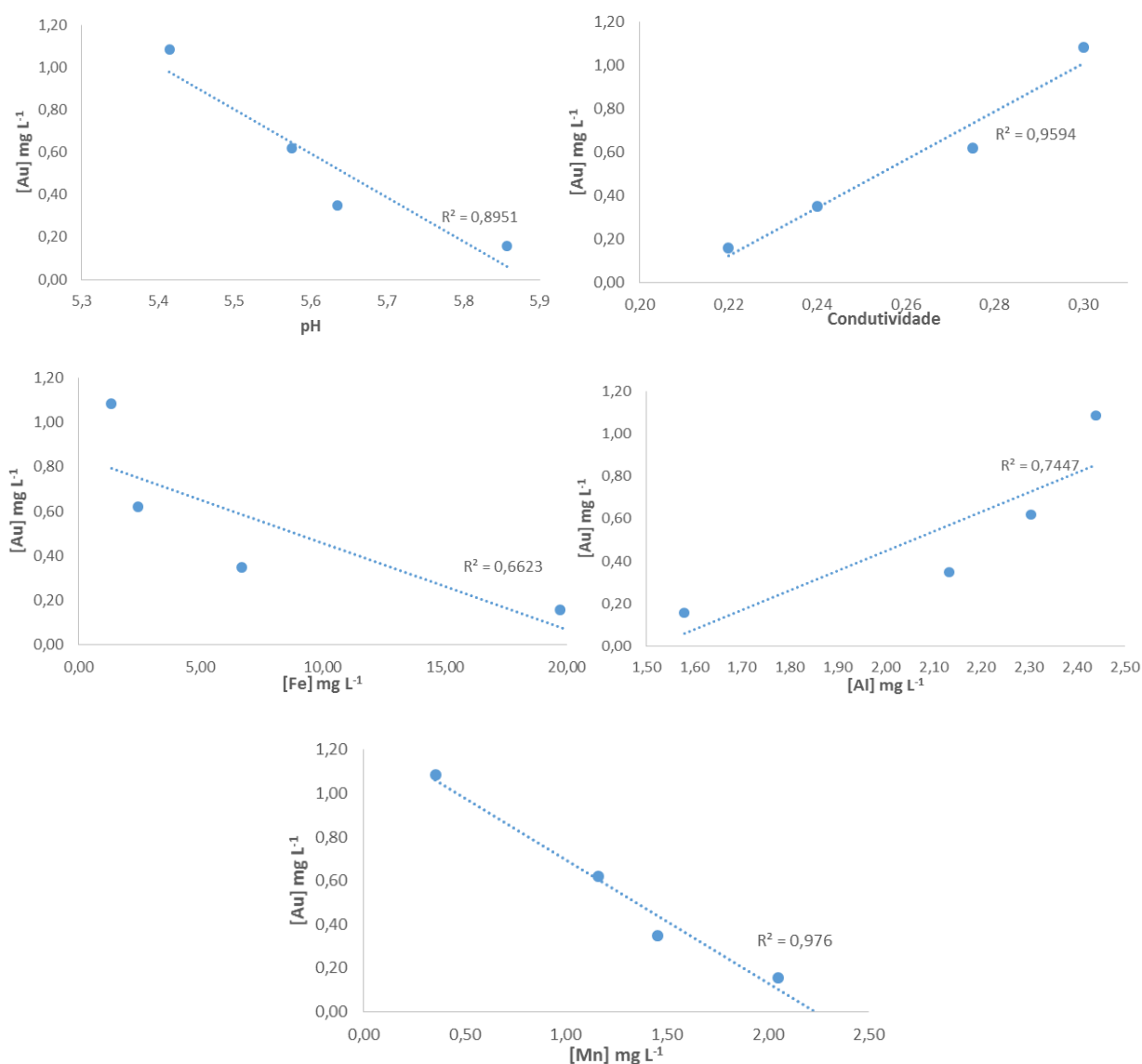


Figura 28 – Gráficos de dispersão que relacionam a concentração de ouro (mg L⁻¹) na solução de solo e as propriedades do solo na suspensão C.

Na suspensão C é onde se observam as melhores correlações. Há uma correlação positiva entre a concentração de ouro e a condutividade assim como com a concentração de alumínio. Pelo contrário, existe uma correlação negativa entre a concentração de ouro e as concentrações de ferro e manganês, bem como com o pH. Constata-se assim que para as três suspensões há uma correlação negativa entre a concentração de ouro e as concentrações de ferro e manganês na solução do solo. Em condições de pH ácido, e em particular para valores de pH < 6, os óxidos de ferro e manganês na matriz sólida do

solo dissolvem-se levando a uma maior concentração destes metais em solução. O comportamento químico quer do manganês quer o ferro no solo afetam largamente a disponibilidade de macronutrientes e metais para as plantas (Rodrigues et al., 2010). Neste caso particular, observou-se uma dissolução crescente de ferro e manganês ao longo do tempo, associada a uma diminuição da concentração de ouro em solução. Esta relação poderá dever-se a uma competição entre cátions metálicos pelos lugares de sorção na fração sólida do solo, no entanto os mecanismos geoquímicos desta associação deverão no futuro ser alvo de uma investigação mais aprofundada.

3.3. Avaliação da transferência solo-solução de nanopartículas de ouro em diferentes tipos de solo – experiência 2

❖ Espectroscopia de UV-VIS

Não foi observada a banda característica das nanopartículas de ouro em nenhuma amostra dos diversos solos.

Propriedades das soluções de solo

❖ pH

Nas Figuras 29 a 36 encontram-se os valores de pH das soluções de solo. Os valores de pH da solução de solo na amostra Aljustrel 7 variaram entre 3,6 e 5,1 para a amostra contendo nanopartículas e 4,0 a 5,2 na sua ausência. Os valores de pH são semelhantes entre a superfície e o fundo. Na amostra Aljustrel 5 o pH apresenta maiores valores à superfície do que no fundo, verifica-se também que os valores de pH aumentam ao longo do tempo. Na amostra Lousal 02 não foi possível monitorizar o valor de pH ao longo de todos os 43 dias, devido ao volume insuficiente de amostra recolhida em alguns casos. No entanto é possível observar que os valores de pH obtidos são semelhantes entre a superfície e o fundo. Para a amostra Lousal 22 os valores de pH variaram entre 7,0 e 8,2. Constata-se que os valores de pH são ligeiramente superiores na superfície. Na amostra Estarreja 11A os valores de pH variaram entre 5,1 e 6,0 sendo semelhantes entre a superfície e o fundo. Para a amostra Lousal 21 os valores de pH na solução de solo variaram entre 7,2 e 8,2. Os valores de pH da solução de solo na amostra Estarreja 5A variaram entre 5,1 e 5,8. É possível observar-se que à superfície o pH apresenta valores ligeiramente superiores. Na amostra Estarreja 12A os valores de

pH da solução de solo variaram entre 5,5 e 6,2. Os valores são semelhantes entre a superfície e o fundo.

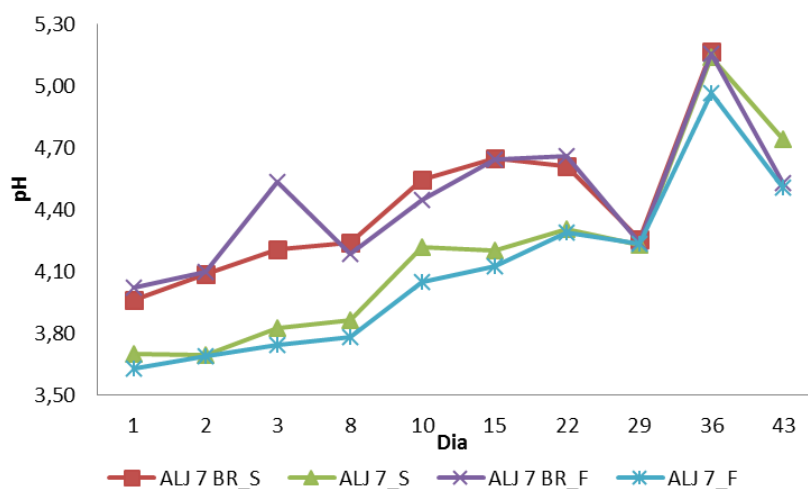


Figura 29 – pH da solução de solo da amostra Aljustrel 7.

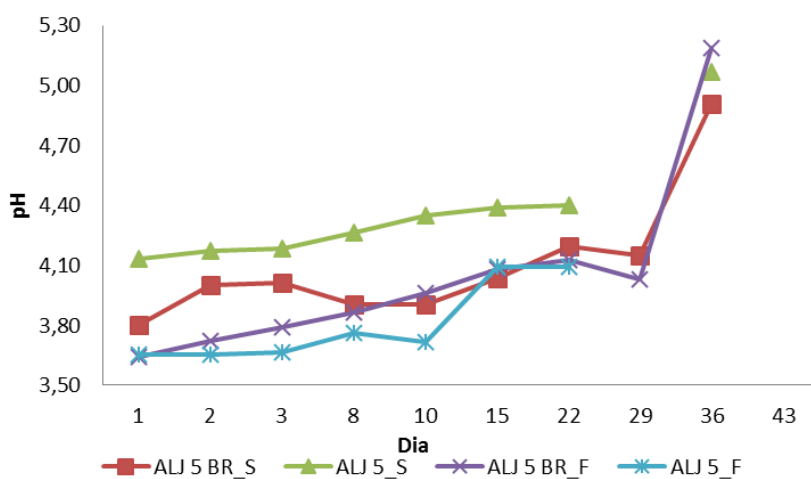


Figura 30 – pH da solução de solo da amostra Aljustrel 5.

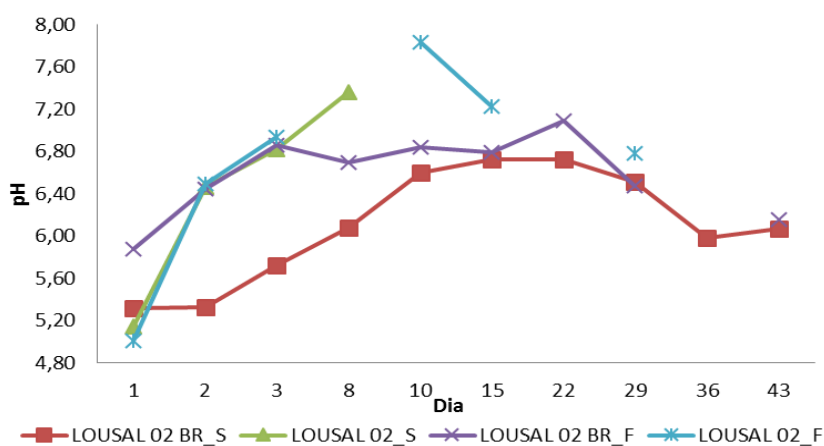


Figura 31 – pH da solução de solo da amostra Lousal 02.

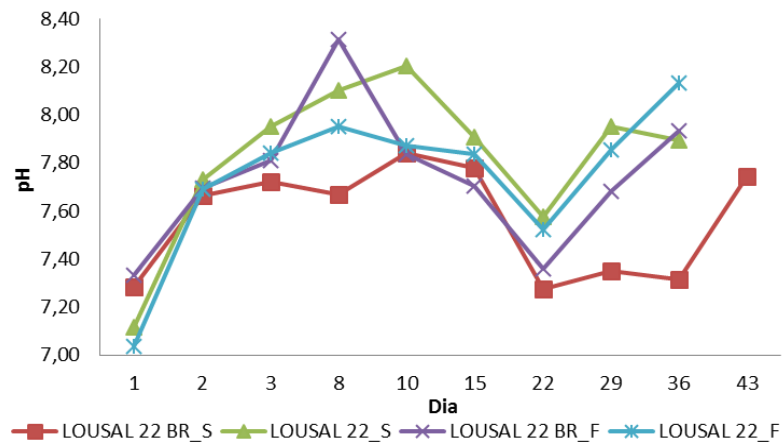


Figura 32 – pH da solução de solo da amostra Lousal 22.

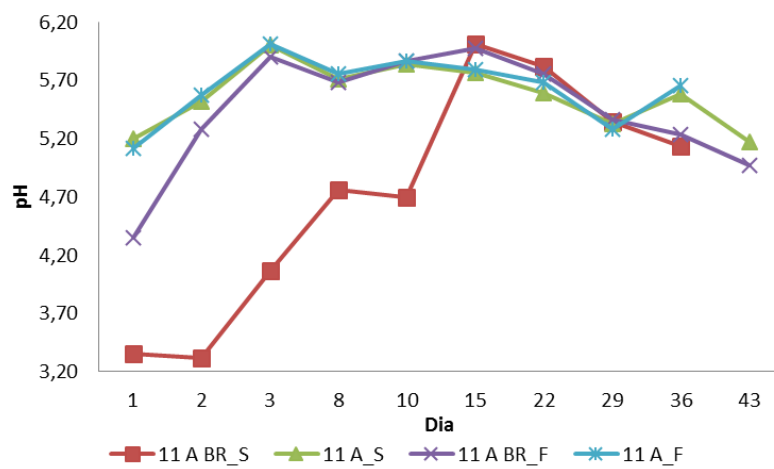


Figura 33 – pH da solução de solo da amostra Estarreja 11A.

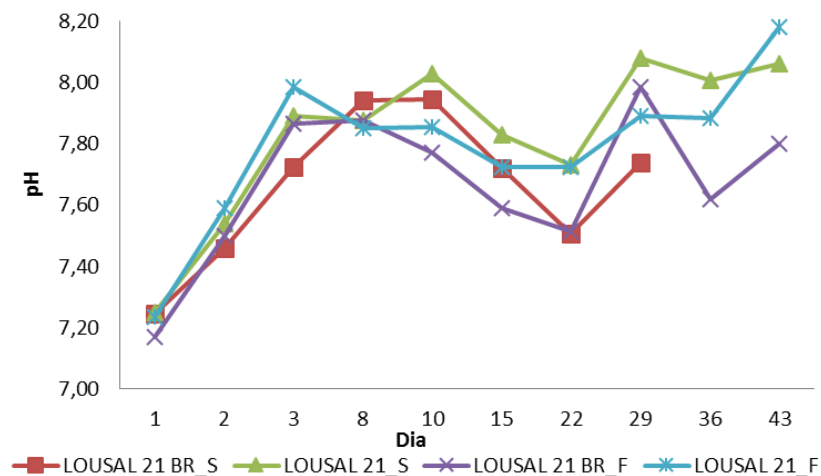


Figura 34 – pH da solução de solo da amostra Lousal 21.

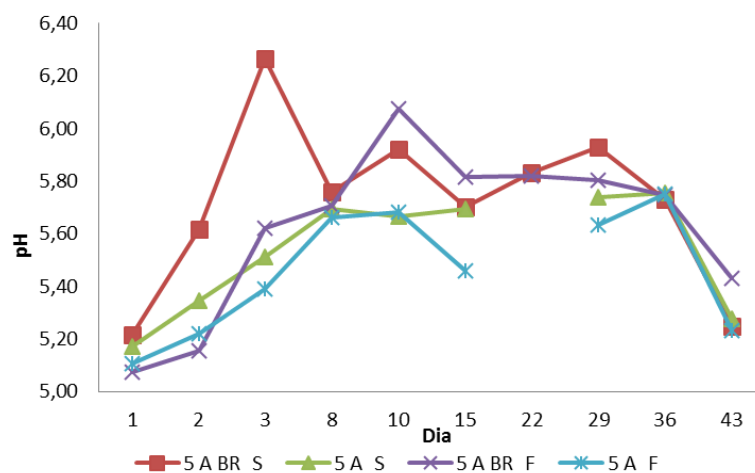


Figura 35 – pH da solução de solo da amostra Estarreja 5A.

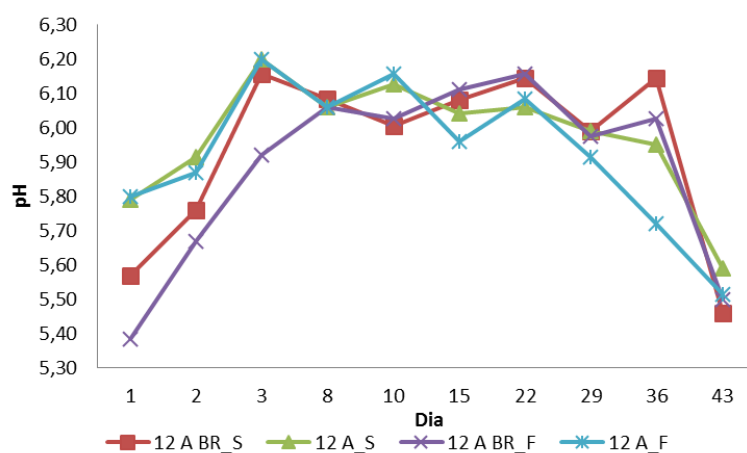


Figura 36 – pH da solução de solo da amostra Estarreja 12A.

Tal como para a experiência 1, foi feito uma análise de variância do pH das amostras de solução de solo recolhidas à superfície e no fundo dos vasos. De acordo com os dados da Tabela 3 com exceção da amostra Estarreja 11 e para um valor de prova inferior a 0,05 não foram detetadas diferenças significativas entre os brancos e as amostras de solo onde foram adicionadas nanopartículas de ouro ou entre as amostras recolhidas à superfície e no fundo do vaso.

Tabela 3 – Análise de variância dos resultados para o pH da solução de solo à superfície (S) e no fundo (F) para as amostras (ALJ7, ALJ5, LOUSAL02, LOUSAL22, EST11A, LOUSAL21, EST5A e EST12A) recolhidas nos vasos onde foram adicionadas a suspensão de nanopartículas (suspensão A). São também apresentados resultados para os valores de pH dos respetivos brancos.

	<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
ALJUSTREL 7 BR_S	Entre grupos	0,232051	1	0,232051	1,301779	0,269707	4,451322
ALJUSTREL 7_S	Dentro de grupos	3,03036	17	0,178256			
	Total	3,262411	18				
ALJUSTREL 7 BR_F	Entre grupos	0,6125	1	0,6125	4,243045	0,054172	4,413873
ALJUSTREL 7_F	Dentro de grupos	2,59837	18	0,144354			
	Total	3,21087	19				
ALJUSTREL 7_F	Entre grupos	0,0405	1	0,0405	0,206593	0,654884	4,413873
ALJ 7_S	Dentro de grupos	3,52867	18	0,196037			
	Total	3,56917	19				
ALJUSTREL 5 BR_S	Entre grupos	0,306375	1	0,306375	3,089972	0,099158	4,543077
ALJUSTREL 5_S	Dentro de grupos	1,487272	15	0,099151			
	Total	1,793647	16				
ALJUSTREL 5 BR_F	Entre grupos	0,224705	1	0,224705	1,636948	0,221543	4,60011
ALJUSTREL 5_F	Dentro de grupos	1,921789	14	0,137271			
	Total	2,146494	15				
ALJUSTREL 5_F	Entre grupos	1,194411	1	1,194411	17,80206	0,001003	4,667193
ALJUSTREL 5_S	Dentro de grupos	0,872222	13	0,067094			
	Total	2,066633	14				
LOUSAL 02 BR_S	Entre grupos	0,33565	1	0,33565	0,770301	0,397356	4,747225
LOUSAL 02_S	Dentro de grupos	5,228871	12	0,435739			
	Total	5,564521	13				
LOUSAL 02 BR_F	Entre grupos	0,06561	1	0,06561	0,149787	0,705	4,667193
LOUSAL 02_F	Dentro de grupos	5,694283	13	0,438022			
	Total	5,759893	14				
LOUSAL 02_F	Entre grupos	0,1712	1	0,1712	0,190489	0,67405	5,317655
LOUSAL 02_S	Dentro de grupos	7,189952	8	0,898744			
	Total	7,361153	9				

	<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
EST 5 A BR_S	Entre grupos	0,157959	1	0,157959	2,100856	0,165414	4,451322
ESTARREJA 5 A_S	Dentro de grupos	1,278191	17	0,075188			
	Total	1,43615	18				
EST 5 A BR_F	Entre grupos	0,129918	1	0,129918	1,653376	0,215739	4,451322
ESTARREJA 5 A_F	Dentro de grupos	1,335811	17	0,078577			
	Total	1,465729	18				
ESTARREJA 5 A_F	Entre grupos	0,0288	1	0,0288	0,54826	0,469757	4,493998
ESTARREJA 5 A_S	Dentro de grupos	0,840478	16	0,05253			
	Total	0,869278	17				
EST 12 A BR_S	Entre grupos	0,005281	1	0,005281	0,111063	0,742788	4,413873
ESTARREJA 12 A_S	Dentro de grupos	0,855933	18	0,047552			
	Total	0,861214	19				
EST 12 A BR_F	Entre grupos	0,010351	1	0,010351	0,177548	0,678478	4,413873
ESTARREJA 12 A_F	Dentro de grupos	1,049423	18	0,058301			
	Total	1,059774	19				
ESTARREJA12 A_F	Entre grupos	0,00968	1	0,00968	0,25587	0,61911	4,413873
ESTARREJA 12 A_S	Dentro de grupos	0,68097	18	0,037832			
	Total	0,69065	19				

	<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
LOUSAL 22 BR_S	Entre grupos	0,321443	1	0,321443	4,175473	0,05683	4,451322
LOUSAL 22_S	Dentro de grupos	1,308723	17	0,076984			
	Total	1,630166	18				
LOUSAL 22 BR_F	Entre grupos	0,0002	1	0,0002	0,002141	0,963668	4,493998
LOUSAL 22_F	Dentro de grupos	1,494728	16	0,09342			
	Total	1,494928	17				
LOUSAL 22_F	Entre grupos	0,027222	1	0,027222	0,267047	0,612389	4,493998
LOUSAL 22_S	Dentro de grupos	1,631006	16	0,101938			
	Total	1,658228	17				
EST 11 A BR_S	Entre grupos	3,378667	1	3,378667	6,84127	0,018087	4,451322
ESTARREJA 11 A_S	Dentro de grupos	8,395712	17	0,493865			
	Total	11,77438	18				
EST 11 A BR_F	Entre grupos	0,18727	1	0,18727	1,077492	0,313799	4,451322
ESTARREJA 11 A_F	Dentro de grupos	2,954623	17	0,173801			
	Total	3,141892	18				
ESTARREJA 11 A_F	Entre grupos	0,022771	1	0,022771	0,29434	0,594494	4,451322
ESTARREJA 11 A_S	Dentro de grupos	1,31514	17	0,077361			
	Total	1,337911	18				
LOUSAL 21 BR_S	Entre grupos	0,126938	1	0,126938	1,96757	0,179812	4,493998
LOUSAL 21_S	Dentro de grupos	1,03224	16	0,064515			
	Total	1,159178	17				
LOUSAL 21 BR_F	Entre grupos	0,075645	1	0,075645	1,247581	0,278703	4,413873
LOUSAL 21_F	Dentro de grupos	1,0914	18	0,060633			
	Total	1,167045	19				
LOUSAL 21_F	Entre grupos	0,006845	1	0,006845	0,103057	0,751889	4,413873
LOUSAL 21_S	Dentro de grupos	1,19555	18	0,066419			
	Total	1,202395	19				

❖ Condutividade

Nas Figuras 37 a 44 encontram-se os valores de condutividade das soluções de solo. Para a amostra Aljustrel 7 os valores de condutividade na solução de solo variam entre 0,31 e 0,61 mS cm⁻¹ no fundo e 0,29 a 0,66 mS cm⁻¹ à superfície. Verifica-se que a condutividade apresenta valores ligeiramente mais altos no fundo e que os valores vão diminuindo ao longo do tempo. No caso da amostra Aljustrel 5 não foi possível monitorizar a condutividade ao longo dos 43 dias devido ao volume de amostra recolhido ser insuficiente para efetuar a medição. Obtiveram-se valores de condutividade no fundo da ordem dos 0,20 a 0,82 mS cm⁻¹ e à superfície entre os 0,33 e 0,53 mS cm⁻¹. No entanto, é possível verificar que a condutividade diminui ao longo do tempo. Na amostra Lousal 02 verificou-se a mesma situação anterior, em que houve poucos dias de recolha. Só foi possível medir a condutividade na solução de solo contendo nanopartículas nos primeiros três dias. À superfície a condutividade apresentou valores de 0,30 a 0,46 mS cm⁻¹ e no fundo valores entre 0,23 a 0,49 mS cm⁻¹. Observa-se que a condutividade é superior à superfície e diminuiu ao longo do tempo.

Relativamente à amostra Lousal 22, esta apresenta valores de condutividade na solução de solo entre 0,21 a 0,58 mS cm^{-1} à superfície e 0,19 a 0,70 mS cm^{-1} no fundo do solo. Com exceção dos primeiros dois dias a condutividade é ligeiramente superior à superfície e verifica-se que diminui ao longo do tempo. Para a amostra Estarreja 11A observam-se valores na ordem de 0,14 a 0,40 mS cm^{-1} quer à superfície quer no fundo do solo. Inicialmente regista-se um valor de condutividade de 0,26 mS cm^{-1} e vai diminuindo até ao dia 10 e depois começa a subir até ao dia 43 registando o valor máximo de 0,40 mS cm^{-1} . Na amostra Lousal 21 os valores de condutividade na solução de solo variam entre 0,38 a 1,2 mS cm^{-1} no fundo e 0,41 a 1,1 mS cm^{-1} à superfície do solo. É possível observar que a condutividade à superfície é semelhante à condutividade no fundo do vaso e que diminui ao longo do tempo. Para a amostra Estarreja 5A obtiveram-se valores de condutividade entre 0,19 e 0,37 mS cm^{-1} no fundo e 0,19 a 0,47 mS cm^{-1} à superfície do solo. É possível observar que a condutividade é ligeiramente superior no fundo do vaso e que diminui ao longo do tempo. Por fim, na amostra Estarreja 12A não foi medida a condutividade na solução de solo contendo nanopartículas no fundo, pois não se conseguiu recolher volume suficiente de amostra. Relativamente à superfície do solo obtiveram-se valores de condutividade entre 1,0 e 3,5 mS cm^{-1} . Constatou-se que a condutividade à superfície do solo da amostra Estarreja 12A diminui com o tempo.

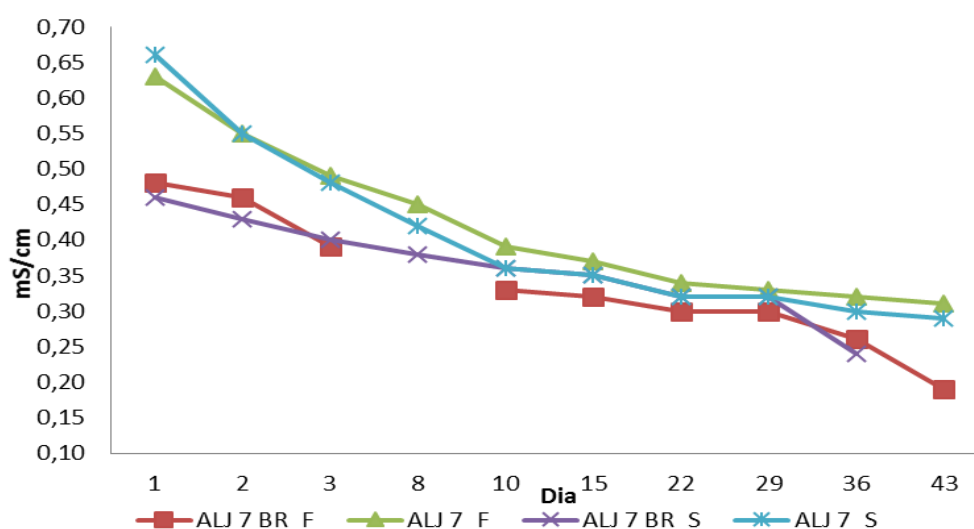


Figura 37 – Condutividade da solução de solo da amostra Aljustrel 7.

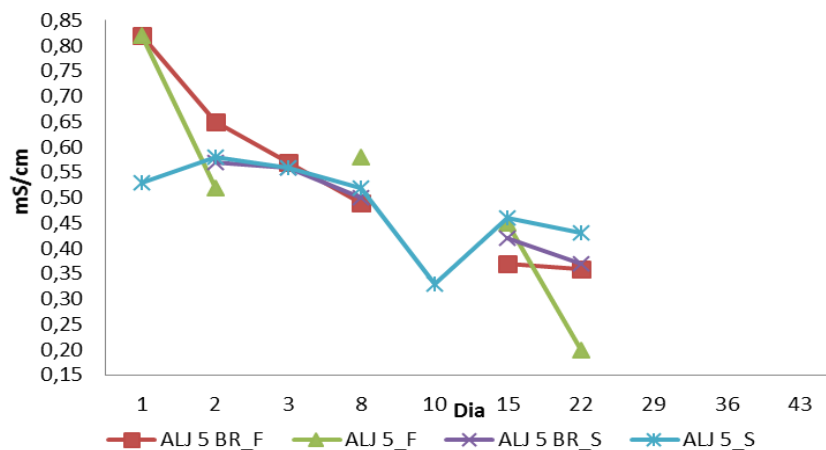


Figura 38 – Condutividade da solução de solo da amostra Aljustrel 5.

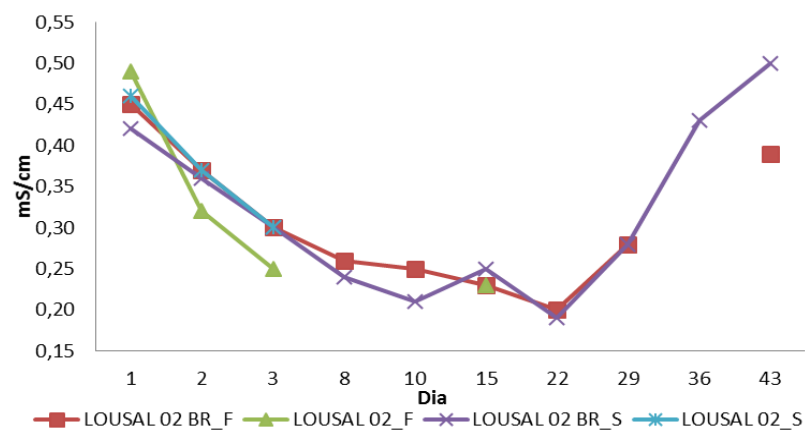


Figura 39 – Condutividade da solução de solo da amostra Lousal 02.

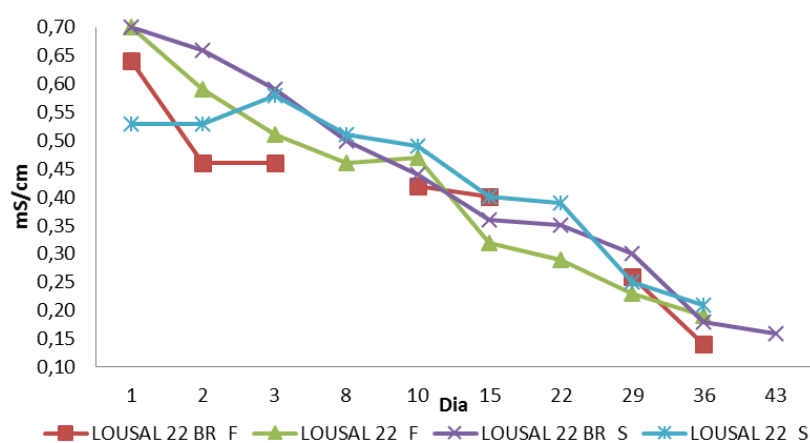


Figura 40 – Condutividade da solução de solo da amostra Lousal 22.

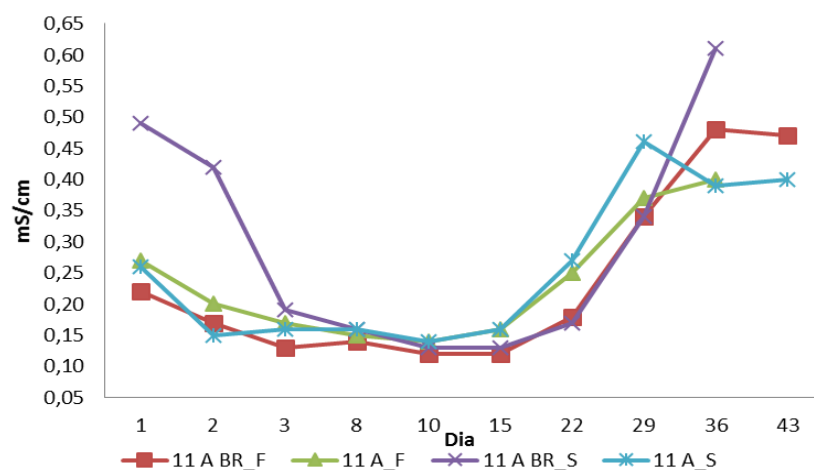


Figura 41 – Condutividade da solução de solo da amostra Estarreja 11A.

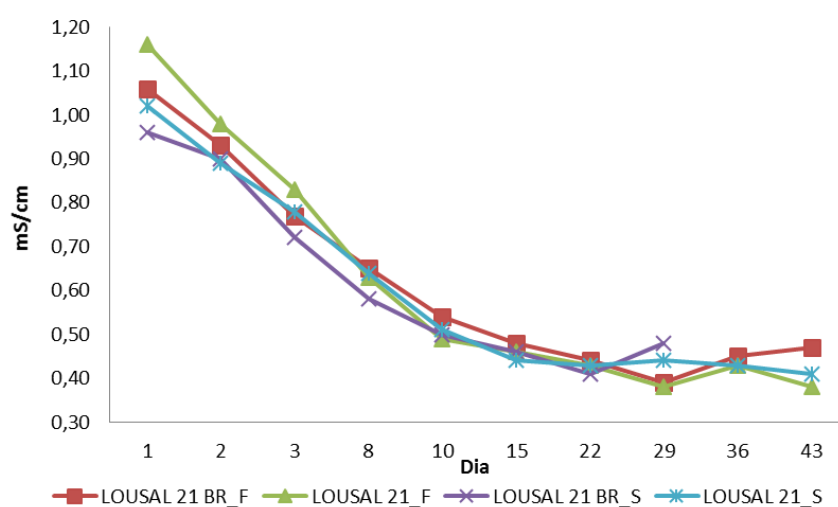


Figura 42 – Condutividade da solução de solo da amostra Lousal 21.

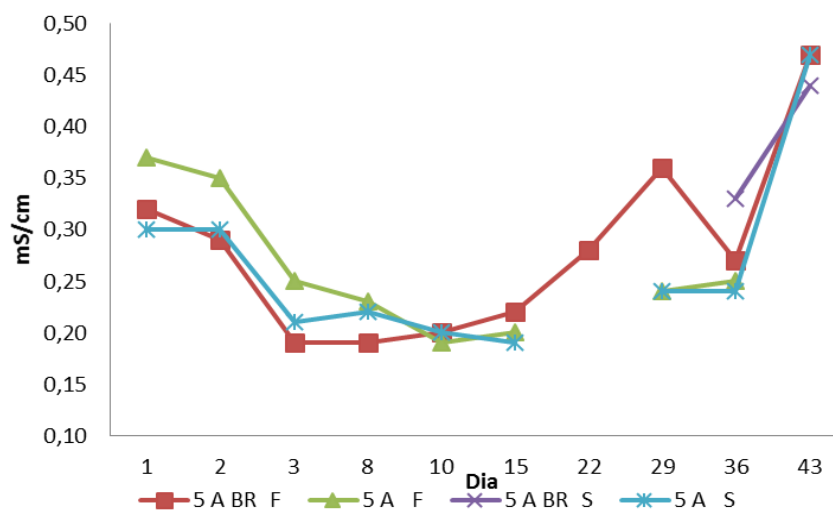


Figura 43 – Condutividade da solução de solo da amostra Estarreja 5A.

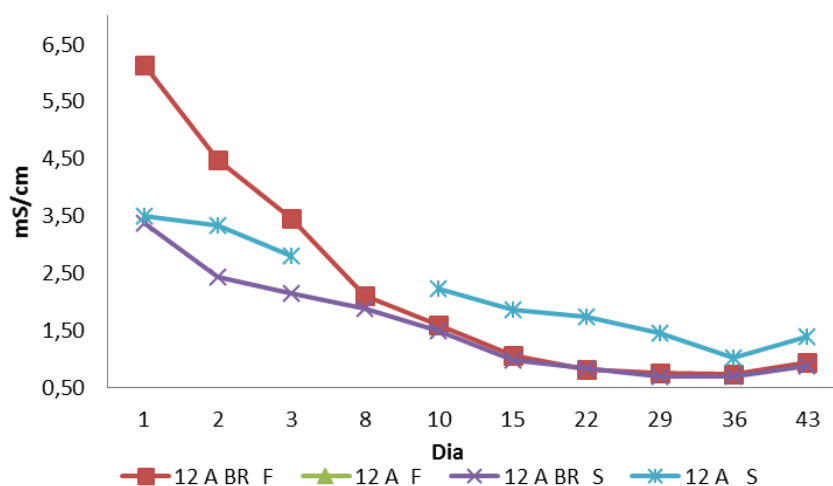


Figura 44 – Condutividade da solução de solo da amostra Estarreja 12A.

Foi efetuada uma análise de variância da condutividade às amostras de solução de solo recolhidas à superfície e no fundo dos vasos. De acordo com os dados da Tabela 4 para um valor de prova inferior a 0,05 não foram detetadas diferenças significativas entre os brancos e as amostras onde foram adicionadas nanopartículas de ouro ou entre as amostras da superfície e do fundo dos vasos.

Tabela 4 – Análise de variância dos resultados para a condutividade da solução de solo à superfície (S) e no fundo (F) para as amostras (ALJ7, ALJ5, LOUSAL02, LOUSAL22, EST11A, LOUSAL21, EST5A e EST12A) recolhidas nos vasos onde foram adicionadas a suspensão de nanopartículas (suspensão A). São também apresentados resultados para os valores de condutividade dos respetivos brancos.

	<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
ALJUSTREL 7 BR_F	Entre grupos	0,031335	1	0,031335	3,030784	0,099765	4,451322
ALJUSTREL 7_F	Dentro de grupos	0,17576	17	0,010339			
	Total	0,207095	18				
ALJUSTREL 7 BR_S	Entre grupos	0,008668	1	0,008668	0,865766	0,365156	4,451322
ALJUSTREL 7_S	Dentro de grupos	0,170206	17	0,010012			
	Total	0,178874	18				
ALJUSTREL 7_S	Entre grupos	0,000845	1	0,000845	0,062745	0,805046	4,413873
ALJUSTREL 7_F	Dentro de grupos	0,24241	18	0,013467			
	Total	0,243255	19				
ALJUSTREL 5 BR_F	Entre grupos	0,002347	1	0,002347	0,05935	0,812988	5,117355
ALJUSTREL 5_F	Dentro de grupos	0,355853	9	0,039539			
	Total	0,3582	10				
ALJUSTREL 5 BR_S	Entre grupos	2,88E-05	1	2,88E-05	0,003788	0,952139	4,964603
ALJUSTREL 5_S	Dentro de grupos	0,076063	10	0,007606			
	Total	0,076092	11				
ALJUSTREL 5_S	Entre grupos	0,002104	1	0,002104	0,085429	0,776044	4,964603
ALJUSTREL 5_F	Dentro de grupos	0,246263	10	0,024626			

	Total	0,248367	11				
LOUSAL 02 BR_F	Entre grupos	0,001017	1	0,001017	0,115753	0,740096	4,844336
LOUSAL 02_F	Dentro de grupos	0,096675	11	0,008789			
	Total	0,097692	12				
LOUSAL 02 BR_S	Entre grupos	0,007943	1	0,007943	0,785497	0,394429	4,844336
LOUSAL 02_S	Dentro de grupos	0,111227	11	0,010112			
	Total	0,119169	12				
LOUSAL 02_S	Entre grupos	0,00503	1	0,00503	0,459409	0,527991	6,607891
LOUSAL 02_F	Dentro de grupos	0,054742	5	0,010948			
	Total	0,059771	6				
EST 5 A BR_F	Entre grupos	0,001604	1	0,001604	0,254952	0,620493	4,493998
ESTARREJA 5 A_F	Dentro de grupos	0,10069	16	0,006293			
	Total	0,102294	17				
ESTARREJA 5 A_S	Entre grupos	4,71E-05	1	4,71E-05	0,007774	0,930908	4,543077
ESTARREJA 5 A_F	Dentro de grupos	0,0908	15	0,006053			
	Total	0,090847	16				

	<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
LOUSAL 22 BR_F	Entre grupos	0,001677	1	0,001677	0,060542	0,809211	4,60011
LOUSAL 22_F	Dentro de grupos	0,387698	14	0,027693			
	Total	0,389375	15				
LOUSAL 22 BR_S	Entre grupos	0,00032	1	0,00032	0,011954	0,914216	4,451322
LOUSAL 22_S	Dentro de grupos	0,455396	17	0,026788			
	Total	0,455716	18				
LOUSAL 22_S	Entre grupos	0,000939	1	0,000939	0,040479	0,843082	4,493998
LOUSAL 22_F	Dentro de grupos	0,371111	16	0,023194			
	Total	0,37205	17				
EST 11 A BR_F	Entre grupos	3,09E-05	1	3,09E-05	0,002067	0,964267	4,451322
ESTARREJA 11 A_F	Dentro de grupos	0,254432	17	0,014967			
	Total	0,254463	18				
EST 11 A BR_S	Entre grupos	0,006961	1	0,006961	0,30572	0,587516	4,451322
ESTARREJA 11 A_S	Dentro de grupos	0,38705	17	0,022768			
	Total	0,394011	18				
ESTARREJA 11 A_S	Entre grupos	0,002001	1	0,002001	0,164314	0,690271	4,451322
ESTARREJA 11 A_F	Dentro de grupos	0,207072	17	0,012181			
	Total	0,209074	18				
LOUSAL 21 BR_F	Entre grupos	5E-06	1	5E-06	7,69E-05	0,993102	4,413873
LOUSAL 21_F	Dentro de grupos	1,17097	18	0,065054			
	Total	1,170975	19				
LOUSAL 21 BR_S	Entre grupos	0,0033	1	0,0033	0,069785	0,795023	4,493998
LOUSAL 21_S	Dentro de grupos	0,756678	16	0,047292			
	Total	0,759978	17				
LOUSAL 21_S	Entre grupos	0,00162	1	0,00162	0,025514	0,874872	4,413873
LOUSAL 21_F	Dentro de grupos	1,1429	18	0,063494			
	Total	1,14452	19				
EST 12 A BR_S	Entre grupos	1,733803	1	1,733803	2,17656	0,158408	4,451322
ESTARREJA 12 A_S	Dentro de grupos	13,54185	17	0,796579			
	Total	15,27565	18				

Concentração de ouro presente na solução de solo

Para a amostra Lousal 2 obteve-se uma concentração de ouro à superfície de 0,14 mg Au L⁻¹ nas primeiras 24 horas. A partir do primeiro dia de recolha não foi possível quantificar a concentração de ouro presente na solução de solo, pois nos restantes dias a concentração obtida está abaixo do limite de deteção (0,12 mg Au L⁻¹). Verifica-se a mesma situação para a amostra Estarreja 5A, que apresenta uma concentração de ouro à superfície de 0,49 mg Au L⁻¹ no primeiro dia. Para a amostra Estarreja 11A, registaram-se valores de concentração de ouro à superfície de 0,32 e 0,41 mg Au L⁻¹ no primeiro e segundo dia, respetivamente.

Com exceção destas três amostras, todas as outras apresentaram valores de concentração de ouro abaixo do limite de deteção quer à superfície quer no fundo de solo.

Por motivos de limitação de quantidade de amostra de solo disponível, na experiência 2 foi utilizada uma massa de solo (250 g) inferior àquela que foi aplicada na primeira experiência (1 kg). Apesar da relação massa de solo:volume de suspensão de nanopartículas ter sido mantida constante, e de não se esperar que esta alteração tivesse impacto nos resultados obtido, não é possível descartar totalmente que a alteração das condições experimentais tenha levado a uma menor capacidade de monitorização da transferência solo-solução de nanopartículas de ouro. Será portanto necessário que no futuro se repita a experiência 2, nas mesmas condições experimentais da primeira para ser possível uma avaliação mais efetiva do impacto da variação das propriedades do solo na lixiviação de nanopartículas de ouro.

Avaliação da influência das propriedades do solo na transferência solo-solução de nanopartículas de ouro

Pelos dados da Tabela 5 é possível observar que apenas em três amostras (Lousal 2, Estarreja 11A e Estarreja 5A) foi detetado ouro na solução de solo, sendo que o pH se situa nos 5,2. Nas restantes o valor da concentração de ouro encontra-se abaixo do limite de quantificação. Uma vez que só foi possível quantificar ouro na solução de solo em 3 amostras, às 24 horas, não é possível fazer uma análise estatística do impacto das propriedades do solo na transferência solo-solução no caso da experiência 2 em que foram utilizados diferentes tipos de solo.

Tabela 5 – Concentração de ouro e propriedades do solo usado na avaliação da transferência solo-solução de nanopartículas de ouro para as amostras à superfície do solo.

		Solo				Solução					
	Amostra	[Au] $\mu\text{g kg}^{-1}$	C org %	Al (ox) mmol kg^{-1}	Fe (ox) mmol kg^{-1}	[Au] mg L^{-1}	[Fe] mg L^{-1}	[Al] mg L^{-1}	[Mn] mg L^{-1}	pH	cond
24h	Aljustrel 7	16,6	2,1	30,5	124	<0,12	0,360	2,59	17,0	3,7	0,66
	Aljustrel 5	13,9	1,6	32,5	77,4	<0,12	0,284	1,85	10,5	4,1	0,53
	Lousal 2	1,00	1,4	8,00	19,7	0,14	0,874	0,380	3,07	5,1	0,46
	Lousal 22	15,0	1,1	7,85	11,3	<0,12	0,177	<0,25	0,181	7,1	0,53
	Estarreja 11A	9,40	1,2	53,0	36,1	0,32	1,14	0,978	0,826	5,2	0,26
	Lousal 21	15,0	2,0	9,54	14,3	<0,12	<0,125	<0,25	0,405	7,3	1,02
	Estarreja 5A	23,7	2,0	61,9	55,7	0,48	1,56	3,72	0,451	5,2	0,30
	Estarreja 12A	2,90	1,3	30,5	32,1	<0,12	0,523	<0,25	1,27	5,8	3,50

3.4. Extrações da fração sólida

Tantos os resultados obtidos para a concentração de ouro nos extratos de solo com $0,43 \text{ mol L}^{-1}$ e $2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ para avaliação da reatividade e disponibilidade do ouro adicionado ao solo na forma de nanopartículas, bem como os resultados obtidos na extração "SBET" para avaliação da possível bio acessibilidade oral do ouro adicionado ao solo apresentam valores de concentração de ouro abaixo do limite de detecção ($0,12 \text{ mg Au L}^{-1}$). De notar que estas extrações foram aplicadas a todos os solos utilizados quer na experiência 1, quer na experiência 2. Os resultados sugerem que mesmo usando uma extração ácida, não é possível extrair o ouro presente na matriz sólida do solo, o que indica que o metal adicionado na forma de nanopartículas não estará disponível para ser lixiviado nestas condições. Conclui-se que o ouro adicionado ao solo na forma de nanopartículas estará fortemente retido e que reatividade e bio acessibilidade das nanopartículas de ouro no solo será reduzida, pelo menos quando comparado com a reatividade de outros metais como o zinco e o chumbo que são facilmente extraídos do solo aquando da aplicação destes testes (Rodrigues et al., 2010).

No futuro deverão ser aplicados testes de extração de solo com soluções de HNO_3 mais concentradas, para se avaliar de forma mais contundente a capacidade do solo de retenção de nanopartículas de solo na sua fração sólida.

Capítulo 4

Conclusão

4. Conclusão

O tamanho médio obtido para as nanopartículas de ouro usadas neste trabalho foi de 17,8 nm. Este valor está de acordo com o tamanho de nanopartículas obtido através da síntese pelo método de redução por citrato. Este tamanho está também de acordo com a literatura que indica que a fração de tamanho mais relevante das nanopartículas em termos ambientais é inferior a 20 nm. Por exemplo, as nanopartículas com tamanhos entre 10-20 μm são utilizadas em aplicações biomédicas, nomeadamente em sensores, uma vez que têm dimensões semelhantes a células humanas. Existem inúmeros métodos de síntese de nanopartículas em que se obtém diversos tamanhos, pelo que o método selecionado foi adequado à finalidade pretendida.

Neste estudo efetuaram-se experiências em vaso para avaliar a possível transferência de nanopartículas de ouro adicionadas ao solo para a solução do solo. Foi realizada uma primeira experiência em que se adicionaram suspensões de nanopartículas de ouro com três concentrações iniciais diferentes (suspensão A: 16,8 mg L^{-1} , B: 8,3 mg L^{-1} e C: 3,2 mg L^{-1}) a um solo industrial (Estarreja). Foi realizada também uma segunda experiência em que se adicionou a suspensão A de nanopartículas de ouro a oito solos com pH e concentrações de carbono orgânico diferentes (solos industriais e de minas).

Através dos resultados obtidos por análise da solução do solo por UV-VIS foi possível detetar a presença de nanopartículas de ouro. Assim, por UV-VIS observou-se a banda característica das nanopartículas de ouro nas amostras de solução de solo recolhidas em vasos onde foram adicionadas as suspensões com três concentrações diferentes de ouro na forma de nanopartículas (suspensão A, B e C). De um modo geral, a banda característica das nanopartículas de ouro está presente na solução do solo até ao terceiro dia de recolha. Através da análise da solução do solo por ICP-OES após digestão ácida foi possível quantificar a concentração de ouro em solução. A análise da concentração de ouro por ICP-OES permitiu detetar ouro nas amostras de solução do solo recolhidas até ao 15º dia, o que indica que além da presença de nanopartículas de ouro na solução de solo poderá também existir ouro dissolvido (Au^{3+}). A concentração de ouro na solução do solo diminuiu consoante a concentração inicial adicionada aos vasos. A percentagem de ouro na solução do solo nunca ultrapassou os 23 %, relativamente à concentração de ouro inicial da suspensão adicionada ao solo. No caso da suspensão A, esta percentagem variou entre 12,6 % às 24 horas até 0,8 % no 15º dia. Todos os valores obtidos a partir do 15º dia são inferiores ao limite de deteção

(0,12 mg L⁻¹). Na suspensão B esta percentagem variou entre 21,8 % às 24 horas até 2,5 % ao 10º dia. Nos dias seguintes já não foi possível detetar ouro em solução. Por fim, na suspensão C variou entre 23,0 % às 24 horas até 4,4 % ao 7º dia.

As concentrações de ouro adicionadas ao solo neste estudo são de uma forma geral inferiores às concentrações iniciais utilizadas em estudos sobre bioacumulação de nanopartículas de ouro ao longo de uma cadeia trófica. Isto acontece porque se pretendeu com este trabalho que os resultados fossem mais representativos daquilo que poderá vir a observar-se no ambiente em termos de níveis de contaminação de solos com nanopartículas de ouro. Assim, para as três suspensões de nanopartículas de ouro adicionadas ao solo verificou-se que a concentração de ouro na solução de solo nos primeiros 15 dias nunca ultrapassou as 3 mg Au L⁻¹. Uma vez que a concentração de ouro na solução do solo é relativamente baixa quando comparada com os valores da literatura associados a riscos de bioacumulação na cadeia trófica, conclui-se que com este nível de contaminação do solo com nanopartículas de ouro não são de esperar riscos de exposição para organismos do solo e/ ou plantas.

De notar no entanto que apesar das concentrações de ouro na solução do solo serem relativamente baixas, se observou impacto da adição das suspensões de nanopartículas de ouro quer no pH quer na condutividade das soluções do solo. Na primeira experiência foi utilizado um solo de pH ácido. No caso da suspensão A, a amostra de solução de solo contendo nanopartículas apresentou valores de pH inferiores ao branco (vaso sem adição de nanopartículas de ouro) quer à superfície quer no fundo do vaso. Para a suspensão B também foram obtidos valores significativamente ($p < 0,01$) inferiores de pH nos vasos com adição de nanopartículas de ouro comparativamente aos brancos, mas apenas nas amostras de superfície, podendo-se concluir que a presença das nanopartículas de ouro afeta o pH da solução do solo. A explicação destas diferenças poderá estar relacionada com a competição de iões Au³⁺ no solo (dissolvidos a partir das nanopartículas de ouro) com os iões H⁺ por lugares de sorção na fração sólida resultando numa maior libertação de iões H⁺ para a solução e levando assim à diminuição do pH desta. O fato de também ocorrerem diferenças entre as amostras de fundo e a superfície poderá indicar uma maior concentração de iões de ouro associada a uma maior retenção de nanopartículas à superfície.

Em relação à condutividade, na primeira experiência a condutividade da solução de solo na suspensão A é superior relativamente às suspensões B e C. Esta situação é devida à maior concentração de ouro na suspensão de nanopartículas. Na suspensão A a

condutividade é mais alta na solução do solo nos vasos onde foram adicionadas nanopartículas, comparativamente ao branco quer no fundo quer à superfície do solo. No caso das suspensões B e C os valores de condutividade são semelhantes entre o branco e a amostra com nanopartículas. Conclui-se assim que a presença das nanopartículas de ouro afeta a condutividade da solução de solo que poderá estar associada a uma maior quantidade de iões de Au^{3+} dissolvidos na amostra de solução do solo onde foram adicionadas nanopartículas de ouro.

Foram também calculadas correlações entre as concentrações de ouro na solução do solo e as respetivas propriedades da solução do solo. Na primeira experiência observou-se uma correlação negativa entre a concentração de ouro e as concentrações de ferro e manganês na solução do solo. Em particular observou-se uma concentração crescente de ferro e manganês ao longo do tempo, associada a uma diminuição da concentração de ouro em solução. Os mecanismos geoquímicos desta associação deverão no futuro ser alvo de uma investigação mais aprofundada.

Finalmente, depois de terminadas as experiências 1 e 2 foram avaliadas as frações reativa e bio acessível do ouro retido na fração sólida do solo. Para isto foram realizadas extrações químicas ($0,43 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$, $2 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ e método *in vitro* de avaliação da bio acessibilidade (“SBET”) do solo dos vasos após secagem à temperatura ambiente até peso constante. Tendo em conta os resultados obtidos para as frações reativa e bio acessível da concentração de ouro, podemos concluir que para estes níveis de contaminação do solo com nanopartículas de ouro, as nanopartículas retidas na fração sólida do solo não estarão disponíveis para serem facilmente lixiviadas, o que indica que o risco para os microrganismos do solo, para os animais e para o Homem não será relevante. No entanto, é importante que no futuro seja feita uma análise mais aprofundada do risco atual para a saúde humana, em particular através de um estudo em que seja avaliado em detalhe o potencial de absorção e translocação das nanopartículas de ouro presentes no solo para as plantas.

Capítulo 5

Bibliografia

5. Bibliografia

Akane, O., Kawasumi, M., Usuki, A., Kojima, Y., Kurauchi, T., Kamigaito, O. (1990). Nylon 6–clay hybrid. In: Schaefer, D., Mark, J. (Eds.), *Polymer Based Molecular Composites: Materials Research Society Symposium Proceedings*, Boston (MA, USA). *Materials Research Society*, 171, 300-310.

Alloway, B. J. (1995). Heavy metals in soil, *Blackie Academic & Professional*, New York. 368 pages.

Baun, A., Sorensen, S. N., Rasmussen, R. F., Hartmann, N. B., Koch, C. B. (2008). Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. *Aquatic Toxicology*, 86, 379–387.

Ben-Moshe, T., Dror, I., Berkowitz, B. (2010). Transport of metal oxide nanoparticles in saturated porous media. *Chemosphere*, 81, 387-393.

Burleson, D. J., Driessen, M. D., Penn, R. L. (2004). On the characterization of environmental nanoparticles. *Journal of Environmental Science and Health Part A Toxic/ Hazard Substances and Environmental Engineering*, 39, 2707–2753.

Bystrzejewska-Piotrowska, G., Golimowski, J., Urban, P. L. (2009). Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*, 29, 2587-2595.

Canas, J. E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M., Ambikapathi, R., Lee, E. H., Olszyk, D. (2008). Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1922–1931.

Choi, O., Deng, K. K., Kim, N. J., Ross Jr., L., Surampalli, R. Y., Hua, Z. (2008). The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Research*, 42, 3066-3074.

Colvin, V. (2003). The potential environmental impacts of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21, 1166-1170.

- Daniel, M. C., Astruc, D. (2004). Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104, 293-346.
- Dinesh, R., Anandaraj, M., Srinivasan, V., Hamza, S. (2012). Engineered nanoparticles in the soil and their potential implications to microbial activity. *Geoderma*, 173-174, 19-27.
- Doshi, R., Braida, W., Christodoulatos, C., Wazne, M., O'Connor, G. (2008). Nanoaluminum: transport through sand columns and environmental effects on plants and soil communities. *Environmental Research*, 106, 296–303.
- Dunford, R., Salinaro, A., Cai, L., Serpone, N., Horikoshi, S., Hidaka, H., Knowland, J. (1997). Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Letters*, 418, 87-90.
- El Badawy, A. M., Luxton, T. P., Silva, R. G., Scheckel, K. G., Suidan, M. T., Tolaymat, T. M. (2010). Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental Science Technology*, 44, 1260-1266.
- El-Ansary A., Al-Daihan, S. (2009). On the toxicity of therapeutically used nanoparticles: An overview. *Journal of Toxicology*, 2009, 1-9.
- EPA (2007) Nanotechnology white paper, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. 136 pages.
- Fang, J., Shan, X. Q., Wen, B., Lin, J. M., Owens, G. (2009). Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns. *Environmental Pollution*, 157, 1101-1109.
- Farré, M., Gajda-Schranz, K., Kantiani, L., Barceló, D. (2009). Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 81-95.

- Fitts, J. P., TGillow, J. B.T., Crosson, G., Maye, M., Gang, O. (2006). Biotransformation of engineered nanoparticles in the environment. Presentation at the 2006 Philadelphia Annual Meeting (22-25 October), Session No. 36, The Geological Society of America.
- García-Negrete, C. A., Blasco, J., Volland, M., Rojas, T. C., Hampel, M., Lapresta-Fernández, A., Jiménez de Haro, M. C., Soto, M., Fernández, A. (2013). Behaviour of Au-citrate nanoparticles in seawater and accumulation in bivalves at environmentally relevant concentrations. *Environmental Pollution*, 174, 134-141
- Gao, J., Zhang, W., Huang, P., Zhang, B., Zhang, X., Xu, B. (2008). Intracellular spatial control of fluorescent magnetic nanoparticles. *Journal of American Chemical Society*, 130, 3710–3711.
- Ghosh, S., Mashayekhi, H., Pan, B., Bhowmik, P., Xing, B. (2008). Colloidal behavior of aluminum oxide nanoparticles As affected by pH and natural organic matter. *Langmuir*, 24, 12385-12391.
- Gomoll, A., Bellare, A., Fitz, W., Thornhill, T., Scott, R., Jemian, P., Long, G. (2000). A nano-composite poly(methyl-methacrylate) bone cement. In: Komarneni, S., Parker, J., Hahn, H. (Eds.), *Nanophase and nanocomposite materials III, Materials Research Society Proceedings*, vol. 581. MRS, Boston (MA, USA), 399-404.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., Nowack, B. (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology*, 43, 9216–9222.
- Guzman, D. K. A., Finnegan, M. P., Banfield, J. F. (2006). Influence of surface potential on aggregation and transport of titania nanoparticles. *Environmental Science & Technology*, 40, 7688-7693.
- Handy R. D., von der Kammer F., Lead J. R., Hassellöv M., Owen R., Crane M. (2008). The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17, 287–314.
- Hanaor, D. A. H., Michelazzi, M., Leonelli, C., Sorrell, C. C. (2012). The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂. *Journal of the European Ceramic Society*, 32, 235-244.

- Hannah, W., Thompson, P. B. (2008). Nanotechnology, risk and the environment: a review. *Journal of Environmental Monitoring*, 10, 291–300.
- Hassellöv, M., Readman, J.W., Ranville, J. F., Tiede, K. (2008). Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17, 344–361.
- Hirsjärvi, S., Peltonen, L., Hirvonen. (2006). Layer-by-layer polyelectrolyte coating of low molecular weight poly (lactic acid) nanoparticles. *Journal of Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 49, 93–99.
- Hong, F. S., Yang, F., Liu, C., Gao, Q., Wan, Z. G., Gu, F. G., Wu, C., Ma, Z. N., Zhou, J., Yang, P. (2005a). Influences of nano-TiO₂ on the chloroplast aging of spinach under light. *Biological Trace Element Research*, 104, 249–260.
- Hong, F. S., Zhou, J., Liu, C., Yang, F., Wu, C., Zheng, L., Yang, P. (2005b). Effect of nano-TiO₂ on photochemical reaction of chloroplasts of spinach. *Biological Trace Element Research*, 105, 269–279.
- Hristozov, D., Malsch, I. (2009). Hazards and risks of engineered nanoparticles for the environment and human health. *Sustainability* 1, 1161–1194.
- Jiang, W., Mashayekhi, H., Xing, B. (2009). Bacterial toxicity comparison between nanoand micro-scaled oxide particles. *Environmental Pollution*, 157, 1619–1625.
- Johnson, R. C. (2007). Studies warn of nanoparticle health effects. *EE Times*, <<http://www.eetimes.com/showArticle.jhtml?articleID=199000914>>.
- Judy, J. D., Unrine, J. M., Bertsch, P. M. (2011). Evidence for Biomagnification of Gold Nanoparticles within a Terrestrial Food Chain. *Environmental Science and Technology*, 45, 776–781.
- Judy, J. D., Unrine, J. M., Rao, W., Bertsch, P. M. (2012a). Bioaccumulation of Gold Nanomaterials by *Manduca sexta* through Dietary Uptake of Surface Contaminated Plant Tissue. *Environmental Science and Technology*, 46, 12672–12678.

Judy, J. D., Unrine, J. M., Rao, W., Wirick, S., Bertsch, P. M. (2012b). Bioavailability of Gold Nanomaterials to Plants: Importance of Particle Size and Surface Coating. *Environmental Science and Technology*, 46, 8467–8474.

Ju-Nam, Y. and Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of the Total Environment*, 400, 396-414.

Kandavelu, V., Kastien, H., Ravindranathan-Thampi, K. (2004). Photocatalytic degradation of isothiazolin-3-ones in water and emulsion of paints containing nanocrystalline TiO₂ and ZnO catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, 48, 101-111.

Keller, A. A., Wang, H., Zhou, D., Lenihan, H. S., Cherr, G., Cardinale, B. J., Miller, R., Ji, Z. (2010). Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environmental Science and Technology*, 44, 1962-1967.

Kim, S., Fisher, B., Eisler, H. J., Bawendi, M. (2003). Type-II quantum dots: CdTe/CdSe (core/shell) and CdSe/ZnTe (core/shell) heterostructures. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 11466–11467.

Kirchner, C., Liedl, T., Kudera, S., Pellegrino, T., Javier, A. M., Gaub, H. E., Stolzle, S., Fertig, N., Parak, W. J. (2005). Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. *Nano Letters*, 5, 331–338.

Klaine, S. J., Alvarez, P. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J., Lead, J. R. (2008). Nanomaterials in the environment: Behavior, Fate, Bioavailability, and Effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1825-1851.

Kostarelos, K., Lacerda, L., Pastorin, G., Wu, W., Wieckowski, S., Luangsivilay, J., Godefroy, S., Pantarotto, D., Briand, J. P., Muller, S., Prato, M., Bianco, A. (2007). Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature Nanotechnology*, 2, 108–113.

Lee, W. M., An, Y. J., Yoon, H., Kweon, H. S. (2008). Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat

(*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1915-1921.

Lei, Z., Fashui, H., Shipeng, L., Chao, L. (2005). Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research*, 104, 83–92.

Li, Q., Zheng, J., Liu, Z. (2003). Site-selective assemblies of gold nanoparticles on an AFM tip-defined silicon template. *Langmuir*, 19, 166–71.

Lin, D., Xing, B. (2007). Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environmental Pollution*, 150, 243–250.

Lin, D., Xing, B. (2008). Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 42, 5580-5585.

Liu, F. K. (2009). Analysis and applications of nanoparticles in the separation sciences: A case of gold nanoparticles. *Journal of Chromatography A*, 1216, 9034-9047.

Long, T. C., Tajuba, J., Sama, P., Saleh, N., Swartz, C., Parker, J., Hester, S., Lowry, G. V., Veronesi, B. (2007). Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 115, 1631–1637.

Lu, C. M., Zhang, C. Y., Wen, J. Q., Wu, G. R., Tao, M. X. (2002). Research of the effect of nanometer materials on germination and growth enhancement of Glycine max and its mechanism. *Soybean Science*, 21, 168–172.

Madrid, F., Díaz-Barrientos, E., Madrid, L. (2008). Availability and bio-accessibility of metals in the clay fraction of urban soils of Sevilla. *Environmental Pollution*, 156, 605-610.

Maynard, A.D. (2006). Nanotechnology: A Research Strategy for Addressing Risk. Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington.

Maynard, A. D., Aitken, R. J. (2007). Assessing exposure to airborne nanomaterials: current abilities and future requirements. *Nanotoxicology*, 1, 26–41.

- McAuliffe, M. E., Perry, M. J. (2007). Are nanoparticles potential male reproductive toxicants? A literature review. *Nanotoxicology*, 1, 204–210.
- Mcmanus, A., Siegel, R., Doremus, R., Bizios, R., 2000. In vitro evaluation of novel polymer/ceramic nanocomposites for orthopedic material applications. *Annals of Biomedical Engineering*, 28, S-15.
- Meyer, A. F., Lipson, D. A., Martin, A. P., Schadt, C. W., Schmidt, S. K. (2004). Molecular and metabolic characterization of cold-tolerant alpine soil *Pseudomonas sensu stricto*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 483–489.
- Murashov, V. (2006). Comments on Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology Letters*, 164, 185–187.
- Murata, T., Kanao-Koshikawa, M., Takamatsu, T. (2005). Effects of Pb, Cu, Sb, In and Ag contamination on the proliferation of soil bacterial colonies, soil dehydrogenase activity, and phospholipid fatty acid profiles of soil microbial communities. *Water, Air, and Soil Pollution*, 164, 103–118.
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Quigg, A., Santschi, P. H., Sigg, L. (2008). Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17, 372–386.
- Niemeyer, C. M. (2001). Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: biotechnology meets materials science. *Angewandte Chemie International Edition*, 40, 4128–58.
- Norwegian Pollution Control Authority (2008). Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles. In: Joner, E.J., Hartnik, T., Amundsen, C.E. (Eds.), Report No. TA 2304/2007. Bioforsk, Ås. 64 pp.
- Nowack, B. and Bucheli, T. D. (2007). Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150, 5-22.
- Nowack, B. (2009). The behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 157, 1063–1064.

Ohde, M., Ohde, H., Wai, C.M. (2005). Recycling nanoparticles stabilised in water-in-CO₂ microemulsions for catalytic hydrogenations. *Langmuir*, 21, 1738–1744.

Peltonen, L and Hirvonen, J. (2008). Physicochemical Characterization of Nano- and Microparticles. *Current Nanoscience*, 4, 101-107.

Peng, X. J., Luan, Z. K., Zing, J., Di, Z. H., Li, Y. H., Tian, B. H. (2005). Ceria nanoparticles supported on carbon nanotubes for the removal of arsenate from water. *Materials Letters*, 59, 399–403.

Poole, C. P., Owens, F. J. (2003). Introduction to Nanotechnology. *John Wiley & Sons, Hoboken*, New Jersey. 402 pages.

Rad, A. G., Abbasib, H., Afzali, M. H. (2011). Gold Nanoparticles: Synthesising, Characterizing and Reviewing Novel Application in Recent Years. *Physics Procedia*, 22, 203-208.

Rejeski, D., Lekas, D. (2008). Nanotechnology field observations: scouting the new industrial west. *Journal of Cleaner Production*, 16, 1014–1017.

Rodrigues, S.M., Henriques, B., Ferreira da Silva, E., Pereira, M.E., Duarte, A.C., Römken, P.F.A.M. (2010). Evaluation of an approach for the characterization of reactive and available pools of twenty potentially toxic elements in soils: Part I – The role of key soil properties in the variation of contaminants reactivity, *Chemosphere*, 81, 1549–1559.

Rosi, N. L., Mirkin, C. A. (2005). Nanostructures in biodiagnostics. *Chemical Reviews*, 105, 1547–62.

Rosická D., Sembera J. (2011). Assessment of influence of magnetic forces on aggregation of zero-valent iron nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* 6, 1-6.

Rotello, V.M. (2003). Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology. 1st Ed. New York: *Springer*. 284 pages.

Salonen, J., Laitinen, L., Kaukonen, A. M., Tuura, J., Björkqvist, M., Heikkilä, T., Vähä-Heikkilä, K., Hirvonen, J., Lehto, V. P. (2005). *Journal of Controlled Release*, 108, 362.

- Savage, N., Diallo, M. S. (2005). Nanomaterials and water purification: opportunities and challenges. *Journal of Nanoparticle Research*, 7, 331-342.
- Sayes, C. M., Warheit, D. B. (2009) Characterization of nanomaterials for toxicity assessment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1, 660–670.
- Schmid, G. Nanoparticles: From Theory to Application. 1st Ed. *Weinheim: Wiley-VCH*, 2004. 434 pages.
- Schmid, K., Riediker, M. (2008). Use of nanoparticles in Swiss industry: a targeted survey. *Environmental Science and Technology*, 42, 2253–2260.
- Schneider, G., Decher, G. (2006). Distance-Dependent fluorescence quenching on gold nanoparticles ensheathed with Layer-by-Layer assembled polyelectrolytes. *Nano letters*, 6, 530-536.
- Serrano, J. M., Peça, J. O., Silva, J. R., Shahidian, S. (2010). Medição e mapeamento da condutividade elétrica aparente do solo em pastagens. *Revista de Ciências Agrárias*, 6-14.
- Shah, V., Belozerova, I. (2009). Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. *Water, Air, and Soil Pollution*, 197, 143–148.
- Shan, G. B., Xing, J. M., Zhang, H. Y., Liu, H. Z. (2005). Biodesulfurization of dibenzothiophene by microbial cells coated with magnetite nanoparticles. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4497–4502.
- Shinde, S. K., Grampurohit, N. D., Gaikwad, D. D., Jadhav, S. L., Gadhave, M. V., Shelke, P. K. (2012). Toxicity induced by nanoparticles. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, 331-334.
- Shoults-Wilson, W. A., Zhurbich, O. I., McNear, D. H., Tsyusko, O. V., Bertsch, P. M., Unrine, J. M. (2011a). Evidence for avoidance of Ag nanoparticles by earthworms (*Eisenia fetida*). *Ecotoxicology*, 20, 385-396.

Shoults-Wilson, W.A., Reinsch, B. C., Tsyusko, O. V., Bertsch, P. M., Lowry, G. V., Unrine, J. M. (2011b). Role of Particle Size and Soil Type in Toxicity of Silver Nanoparticles to Earthworms. *Soil Science Society of America Journal*, 75, 365-377.

Tiede, K., Hassell v,M., Breitbarth, E., Chaudhry, Q., Boxall, A. B. A. (2009). Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. *Journal of Chromatography A*, 1216, 503–509.

Tourinho, P. S., van Gestel, C. A. M., Lofts, S., Svendsen, C., Soares, A. M., Loureiro, S. (2012). Metal-based nanoparticles in soil: fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 1679-1692.

Unrine, J., Bertsch, P., Hunyadi, S. (2008). Bioavailability, Trophic Transfer, and Toxicity of Manufactured Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Terrestrial Environments. *John Wiley & Sons*, New York, USA.

Unrine, J. M., Tsyusko, O.V., Hunyadi, S. E., Judy, J. D., Bertsch, P. M. (2010a). Effects of Particle Size on Chemical Speciation and Bioavailability of Copper to Earthworms (*Eisenia fetida*) Exposed to Copper Nanoparticles. *Journal of Environmental Quality*, 39, 1942-1953.

Unrine, J. M., Hunyadi, S. E., Tsyusko, O. V., Rao, W., Shoults-Wilson, W. A., Bertsch, P. M. (2010b). Evidence for Bioavailability of Au Nanoparticles from Soil and Biodistribution within Earthworms (*Eisenia fetida*). *Environmental Science and Technology*, 44, 8308-8313.

Unrine, J. M., Colman, B. P., Bone, A. J., Gondikas, A. P., Matson, C. W. (2012a). Biotic and Abiotic Interactions in Aquatic Microcosms Determine Fate and Toxicity of Ag Nanoparticles. Part 1. Aggregation and Dissolution. *Environmental Science and Technology*, 46, 6915-6924.

Unrine, J. M., Shoults-Wilson, W. A., Zhurbich, O., Bertsch, P. M., Tsyusko, O. V. (2012b). Trophic Transfer of Au Nanoparticles from Soil along a Simulated Terrestrial Food Chain. *Environmental Science and Technology*, 46, 9753-9760.

- Verma, A., Uzun, O., Hu, Y., Hu, Y., Han, H. S., Watson, N., Chen, S., Irvine, D. J., Stellacci, F. (2008). Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nature Materials*, 7, 588–595.
- Wangoo, N., Bhasin, K. K., Boro, R., Suri, C. R. (2008). Facile synthesis and functionalization of water-soluble gold nanoparticles for a bioprobe. *Analytica Chimica Acta*, 610, 142-148.
- Weir, E., Lawlor, A., Whelan, A., Regan, F. (2008). The use of nanoparticles in antimicrobial materials and their characterization. *Analyst*, 133, 835–845.
- Yang, L., Watts, D. J. (2005). Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicology Letters*, 158, 122–132.
- Yang, F., Hong, F. S., You, W. J., Liu, C., Gao, F. Q., Wu, C., Yang, P. (2006). Influences of nano-anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biological Trace Element Research*, 110, 179–190.
- Yoon, K. Y., Byeon, J. H., Park, J. H., Hwang, J. (2007). Susceptibility constants of Escherichia coli and Bacillus subtilis to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 373, 572–5.
- Zhang, W. X. (2003). Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview. *Journal of Nanoparticle Research*, 5, 323–332.
- Zheng, L., Hong, F. S., Lu, S. P., Liu, C. (2005). Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biological Trace Element Research*, 104, 83-91.